

Université de Montréal

Étude comparative de gènes impliqués lors de la détermination et de la
différenciation du sexe chez les mammifères

par

Véronique Paradis

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
En Biologie Moléculaire

Janvier 2004

©Véronique Paradis, 2004



QH
506
U54
2004
v.017

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude comparative de gènes impliqués lors de la détermination et de la différenciation du
sexe chez les mammifères

Présenté par
Véronique Paradis

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Milot
Président-rapporteur

Dr David W. Silversides
Directeur de recherche

Dr Robert Viger
Évaluateur externe
Université Laval, Québec

RÉSUMÉ

Chez les mammifères mâles, le facteur de transcription SRY déclenche la cascade de la formation des testicules lors de la détermination du sexe. Par contre, le mode d'action de SRY et les gènes ciblés par cette action sont encore peu connus. De récentes études de criblage d'expression de gènes par réseau à haute densité chez les souris (Grimmond, S.*et al.*, 2000) ont révélé de nouveaux gènes candidats mâle-spécifiques, *Vnn1* et *Pn1*, qui seraient vraisemblablement impliqués dans la détermination du sexe tout de suite après l'expression du gène *Sry*. De plus, des expériences de souris knock-out pour le gène *fgf9* ont démontré un phénotype d'inversement de sexe chez les souris mâles (Colvin, J.S., *et al.* 2001).

Nos hypothèses de travail sous-tendent que l'expression des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* serait contrôlée directement par SRY ou indirectement par d'autres facteurs de transcription impliqués lors de la détermination et de la différenciation des testicules, comme SOX9, SF-1 et GATA4. De plus, des séquences régulatrices devraient pouvoir être identifiées à l'intérieur de ces gènes qui seraient communes à celles des gènes homologues retrouvés chez les autres espèces.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons développé des stratégies pour cloner rapidement les séquences codantes et les séquences génomiques des trois gènes à étudier (*VNN1*, *PN1* et *FGF9*) chez le porc. Nous avons fait des analyses comparatives entre les séquences des gènes entre eux et entre les espèces. Nous avons ensuite inséré les séquences 5'flanquantes d'ADN génomique porcine des gènes *VNN1* et *PN1* dans un vecteur en amont des séquences d'un marqueur GFP. Des études de co-transfection avec ces constructions dans des cellules CV-1 nous ont permis d'étudier l'effet de différents facteurs de transcription (SRY, SOX9, WT1, SF1, LHX9, GATA4) sur l'activité transcriptionnelle des séquences promotrices des gènes *VNN1* et *PN1*. Premièrement, nous avons observé que le facteur SOX9 est capable de transactiver le promoteur *VNN1* porcin, mais pas le promoteur *PN1* porcin. Deuxièmement, le facteur GATA4 cause un effet contradictoire sur la régulation des gènes *VNN1* et *PN1* porcin. En effet, il inhibe l'expression du promoteur

VNN1 porcin, mais il transactive le promoteur *PN1* porcin. Troisièmement, l'effet transactivateur de GATA4 sur le promoteur *PN1* porcin est complètement annulé par le facteur SOX9. Finalement, il semble que l'effet transactivateur de SOX9 sur le promoteur *VNN1* porcin est spécifique à l'espèce porcine étant donné qu'il ne démontre aucun effet significatif sur les promoteurs *VNN1* humain et murin.

Ces observations intéressantes chez le porc sont le point de départ d'une série d'expériences qui permettront une meilleure compréhension du modèle proposé de détermination et de différenciation du sexe.

Mots clés : détermination du sexe mammalien, différenciation du sexe mammalien, testicules, *VNN1*, *PN1*, *FGF9*, porc.

SUMMARY

In male mammals, the transcription factor *SRY* initiates sex determination and the development of testes. At the present time, neither the mode of action of *SRY* nor the direct gene targets of *SRY* are known. Recent high density gene expression studies (Grimmond *et al.*, 2000) have identified candidate genes, *Vnn1* and *Pnl*, that are expressed within the male genital ridge immediately after the expression of *SRY* and that may be implicated in sex determination and differentiation. In addition, gene knock-out experiments for *Fgf9* revealed a sex reversal phenotype in male mice (Colvin *et al.*, 2001).

Our working hypothesis for the present studies is that the expression of *VNN1*, *PN1* and *FGF9* within the developing genital ridge is controlled either directly by *SRY* or indirectly by additional transcription factors implicated in the determination and differentiation of testes, such as *SOX9*, *SF1* and *GATA4*. In addition the transcriptional control sequences of these genes should be identifiable within these genes and should be conserved between homologous genes from different mammalian species.

To allow our studies we have developed strategies for rapid cloning of coding and genomic (promoter) sequences for three candidate genes (*VNN1*, *PN1* and *FGF9*) from the pig. We have compared these gene sequences with human and mouse sequences, to reveal high conservation (*FGF9*), intermediate (*VNN1*) and more modest (*VNN1*) conservation of sequences. To initiate functional studies, we inserted 5' flanking genomic DNA sequences for pig *VNN1* and *PN1* into an expression vector for the marker protein GFP. We have used co-transfection studies in CV-1 cells to study the effect of different transcriptional factors (*SRY*, *SOX9*, *WT1*, *SF1*, *LHX9*, *GATA4*) on the transcriptional activity of promoter sequences for porcine *VNN1* and *PN1*. We observed that *SOX9* was able to transactivate the porcine *VNN1* promoter but not the porcine *PN1* promoter. We further observed that *GATA4* effects the regulation of porcine *VNN1* and *PN1* promoters in a contrasting fashion, with an inhibition of the porcine *VNN1* promoter and an activation of the *PN1* promoter. Additionally we observed that the transactivation effect of *GATA4* on the porcine *PN1* promoter is nullified by *SOX9*. Finally, the effect of *SOX9* on the *VNN1*

promoter appears species specific, as the transactivation seen for the porcine promoter was not seen for the human and mouse promoters.

The characterization of the coding sequences for porcine *VNN1*, *PN1* and *FGF9*, as well as the promoter sequences for *VNN1* and *PN1* contributes to our understanding of the currently held model of mammalian sex determination and differentiation, and lays the foundation for future studies on gene activation within the male genital ridge at the time and immediately subsequent to *SRY* expression.

Key words: mammalian sex determination, mammalian sex differentiation, testes, *VNN1*, *PN1*, *FGF9*, pig.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLES.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xvi
DÉDICACES	xx
REMERCIEMENTS	xxi
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 LA REPRODUCTION SEXUÉE ET LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES ANIMAUX	2
1.1.1 La détermination sexuelle environnementale	2
1.1.2 La détermination sexuelle dose-dépendante.....	2
1.1.3 La détermination sexuelle causée par la présence d'un gène dominant.....	3
1.2 LA RECHERCHE DU TDF.....	4
1.3 ORIGINE ET DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES.....	5
1.3.1 Les crêtes génitales.....	5
1.3.2 Les cellules primordiales germinales	6
1.3.3 Les gonades indifférenciées.....	6
1.3.4 Les gonades bipotentielles.....	7
1.3.5 Les testicules	7
1.3.6 Les ovaires	10
1.3.7 La différenciation des voies génitales internes	11
1.4 DESCRIPTION DES GÈNES ESSENTIELS AU DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES	13
1.4.1 Le gène <i>SRY</i>	13
1.4.2 Le gène <i>SOX9</i>	16
1.4.3 Des protéines qui interagissent avec <i>SRY</i> et <i>SOX9</i>	18
1.4.4 Le gène <i>MIS</i>	20
1.4.5 Le gène <i>SF1</i>	20
1.4.6 Le gène <i>WT1</i>	21
1.4.7 Le gène <i>GATA4</i>	23
1.4.8 Le gène <i>DMRT1</i>	24
1.4.9 Les gènes <i>LHX1</i> (<i>LIM1</i>) et <i>LHX9</i>	26
1.4.10 Le gène <i>DAX1</i>	27
1.4.11 Le gène <i>WNT4</i>	29

1.5	RÔLE ET INTÉGRATION DES GÈNES DANS LE MÉCANISME DE LA DÉTERMINATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.....	29
1.5.1	Au niveau de la formation des gonades bipotentielles	30
1.5.2	Au niveau de la détermination du sexe.....	31
1.5.3	La régulation de l'expression du gène <i>SRY</i>	31
1.5.4	Les conséquences de l'expression de <i>SRY</i>	33
1.5.5	La relation entre <i>SRY</i> et <i>SOX9</i>	33
1.5.6	La régulation de l'expression du gène <i>MIS</i>	35
1.5.7	Le contrôle de l'activité de <i>GATA4</i>	36
1.5.8	Les nombreux rôles de <i>SF1</i>	36
1.5.9	Le rôle de <i>DAX1</i> et la relation <i>SF1/DAX1</i>	37
1.5.10	Au niveau de la différenciation des organes sexuels.....	39
1.5.11	Schéma des processus de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères.	40
1.6	NOUVEAUX GÈNES CANDIDATS POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS LORS DU DÉVELOPPEMENT DES TESTICULES.	40
1.6.1	Le gène <i>VNNI</i>	40
1.6.2	Le gène <i>PN1</i>	44
1.6.3	Le gène <i>FGF9</i>	45
1.7	LE PORC COMME MODÈLE D'ÉTUDE DE LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.....	46
1.8	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	47
2	MÉTHODOLOGIE	49
2.1	CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE <i>VNNI</i> PORCIN	50
2.1.1	Stratégie générale	50
2.1.2	Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin.....	50
2.1.2.1	Récolte de tissus porcins.....	50
2.1.2.2	Extraction de l'ARN total de rein.....	50
2.1.2.3	Amplification d'un premier fragment d'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin	51
2.1.2.3.1	Transcription inverse (RT).....	51
2.1.2.3.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	51
2.1.2.4	Isolation des fragments d'ADNc amplifiés du gène <i>VNNI</i> porcin.....	55
2.1.2.5	Ligation des fragments d'ADNc amplifiés du gène <i>VNNI</i> porcin.....	55
2.1.2.6	Transformation dans les bactéries compétentes	56
2.1.2.6.1	Bactéries compétentes pour la transformation chimique.....	56
2.1.2.6.2	Transformation des bactéries compétentes	56
2.1.2.7	Sélection des clones recombinants	56
2.1.2.8	Mini-préparation d'ADN plasmidique.....	57
2.1.2.9	Séquençage d'ADN double brin.....	58
2.1.3	Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin.....	58
2.1.3.1	Amplification de l'extrémité 3' du gène <i>VNNI</i> porcin.....	58
2.1.3.2	Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène <i>VNNI</i> porcin.....	61
2.1.4	Clonage de l'extrémité 5' non- transcrite de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin...	61
2.1.4.1	Isolation d'ARN poly(A)+ de rein	61
2.1.4.2	Synthèse du premier brin d'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin.....	61
2.1.4.3	Purification de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin.....	62

2.1.4.4	Addition d'une queue poly (dC) à l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin.....	62
2.1.4.5	Amplification du bout 5' non- transcrit de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcin par PCR	62
2.1.4.6	Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène <i>VNNI</i> porcin	63
2.2	CLONAGE DES SÉQUENCES GÉNOMIQUES DU BOUT 5' DU GÈNE <i>VNNI</i> PORCIN	63
2.2.1	Stratégie générale	63
2.2.2	Clonage d'un premier fragment d'ADN génomique 5' de 1,9kb en amont de l'ATG du gène <i>VNNI</i> porcin	64
2.2.2.1	Immunobuvardage de type Southern	64
2.2.2.1.1	Production et marquage radioactif de la sonde	64
2.2.2.1.2	Préparation de l'ADN génomique de porc.....	65
2.2.2.1.3	Transfert de l'ADN génomique de porc sur la membrane.....	65
2.2.2.1.4	Préhybridation, hybridation et détection.....	65
2.2.2.2	Création de la mini-génothèque de taille sélectionnée porcine.....	66
2.2.2.2.1	Digestion industrielle de l'ADN génomique de porc avec PstI	66
2.2.2.2.2	Ligation de la mini-génothèque de taille sélectionnée porcine.....	66
2.2.2.3	Amplification de séquences génomiques en amont de l'ATG du gène <i>VNNI</i> porcin	67
2.2.2.4	Isolation des fragments génomiques 5' du gène <i>VNNI</i> porcin	67
2.2.3	Clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique 5' en amont du premier fragment d'ADN génomique 5' du gène <i>VNNI</i> porcin	68
2.2.3.1	Création de mini-librairies d'ADN génomique porcin non-clonées	68
2.2.3.1.1	Préparation de l'ADN génomique de porc.....	68
2.2.3.1.2	Ligation des différentes digestions d'ADN génomique de porc	69
2.2.3.2	Amplification de séquences génomiques en amont de la séquence du premier fragment de promoteur du gène <i>VNNI</i> porcin.....	69
2.2.3.3	Isolation des fragments génomiques 5' du gène <i>VNNI</i> porcin	70
2.2.3.4	Ligation et transformation du fragment de 3.3kb de la mini-librairie StuI.....	70
2.3	CLONAGE DE 5KB DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE <i>VNNI</i> PORCIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (CONSTRUCTION 5KB pVANP-GFP).....	70
2.3.1	Amplification de 5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène <i>VNNI</i> porcin.....	70
2.3.2	Isolation du fragment de 5kb d'ADN génomique 5' du gène <i>VNNI</i> porcin.....	71
2.3.3	Préparation et ligation de l'insert génomique 5' de 5kb du gène <i>VNNI</i> porcin dans le vecteur d'expression pEGFP-1	71
2.3.4	Transformation dans les bactéries compétentes.....	72
2.3.5	Sélection des recombinants et mini-préparations d'ADN plasmidique.	72
2.3.6	Confirmation des clones positifs par séquençage	72
2.4	CLONAGE DE 5KB DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE <i>VNNI</i> HUMAIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (CONSTRUCTION 5KB hVANP-GFP).	73
2.4.1	Amplification de 5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène <i>VNNI</i> humain.....	73
2.4.2	Isolation du fragment génomique 5' du gène <i>VNNI</i> humain.....	73

2.4.3	Préparation et ligation de l'insert génomique 5' du gène <i>VNNI</i> humain dans le vecteur d'expression pEGFP-1.....	73
2.5	CLONAGE DE 4KB DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE <i>VANIN-1</i> MURIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (CONSTRUCTION 4KB MVANP-GFP).....	74
2.5.1	Amplification de 4kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène <i>Vanin-1</i> murin	74
2.5.2	Isolation du fragment génomique 5' de 4kb du gène <i>Vanin-1</i> murin.....	74
2.5.3	Ligation, transformation et sélection des plasmides recombinants contenant les fragments génomiques 5' de 4kb du gène <i>Vanin-1</i> murin.....	75
2.6	TRANSFECTIONS DES CELLULES CV-1.....	75
2.7	CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE <i>PN1</i> PORCIN.....	76
2.7.1	Stratégie générale	76
2.7.2	Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin.....	76
2.7.2.1	Amplification du premier fragment d'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin	76
2.7.2.2	Isolation des fragments d'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin	80
2.7.3	Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin.....	80
2.7.3.1	Amplification de l'extrémité 3' du gène <i>PN1</i> porcin	80
2.7.3.2	Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène <i>PN1</i> porcin.....	80
2.7.4	Clonage d'un bout 5' contenant l'ATG de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin	80
2.7.4.1	Amplification d'un bout 5' du gène <i>PN1</i> porcin	80
2.7.4.2	Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène <i>PN1</i> porcin.....	81
2.8	CLONAGE DES SÉQUENCES 5'FLANQUANTES DU GÈNE <i>PN1</i> PORCIN.....	81
2.8.1	Stratégie générale	81
2.8.2	Clonage d'un premier fragment d'ADN génomique 5' de 500p en amont de l'ATG du gène <i>PN1</i> porcin.....	81
2.8.2.1	Amplification des fragments génomiques 5' du gène <i>PN1</i> porcin.....	81
2.8.2.2	Isolation des fragments génomiques 5' du gène <i>PN1</i> porcin.....	82
2.8.3	Clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique 5' de 3kb en amont du premier fragment génomique 5' du gène <i>PN1</i> porcin	82
2.8.3.1	Amplification des fragments génomiques 5' du gène <i>PN1</i> porcin.....	82
2.8.3.2	Isolation des fragments génomiques 5' du gène <i>PN1</i> porcin.....	82
2.9	CLONAGE DE 3,5KB DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE <i>PN1</i> PORCIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (CONSTRUCTION 3,5KB PPN1P-GFP).	83
2.9.1	Amplification de 3,5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène <i>PN1</i> porcin.....	83
2.9.2	Isolation du fragment génomique 5' de 3,5kb du gène <i>PN1</i> porcin.....	83
2.9.3	Préparation et ligation de l'insert génomique 5' de 3,5kb du gène <i>PN1</i> porcin dans le vecteur d'expression pEGFP-1	84
2.10	TRANSFECTIONS DES CELLULES CV-1.....	84
2.11	CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE <i>FGF9</i> PORCIN.....	85
2.11.1	Stratégie générale	85
2.11.2	Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcin.....	85
2.11.2.1	Amplification d'un premier fragment d'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcin	85
2.11.2.2	Isolation du premier fragment amplifié du gène <i>FGF9</i> porcin	85

2.11.3	Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcine...	88
2.11.3.1	Amplification de l'extrémité 3' du gène <i>FGF9</i> porcine.....	88
2.11.3.2	Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène <i>FGF9</i> porcine.....	88
2.11.4	Clonage d'un bout 5' contenant l'ATG de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcine.....	88
2.11.4.1	Amplification d'un bout 5' du gène <i>FGF9</i> porcine.....	88
2.11.4.2	Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène <i>FGF9</i> porcine.....	89
3	RÉSULTATS.....	90
3.1	GÈNE <i>VNNI</i> PORCIN.....	91
3.1.1	Amplification de la séquence de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcine.....	91
3.1.2	Séquence de l'ADNc du gène <i>VNNI</i> porcine.....	94
3.1.3	Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène <i>VNNI</i> chez les autres espèces.....	94
3.1.4	Comparaison entre les séquences en acides aminés de la protéine VANIN-1 chez le porc, l'humain, la souris et le chien.	94
3.1.5	Stratégies de clonage des séquences génomiques 5' du gène <i>VNNI</i> porcine...	104
3.1.6	Séquence de 5.15kb de la région promotrice du gène <i>VNNI</i> porcine.....	111
3.1.7	Comparaison des séquences promotrices du gène <i>VNNI</i> chez le porc, l'humain et la souris.....	111
3.1.8	Recherche de sites potentiels de facteurs de transcription.....	111
3.1.9	Études de co-transfections du promoteur du gène <i>VNNI</i> porcine dans les cellules CV-1.....	124
3.1.10	Étude comparative in vitro de l'effet du facteur SOX9 sur le promoteur <i>VNNI</i> chez le porc, l'humain et la souris.....	124
3.2	GÈNE <i>PN1</i> PORCIN.....	131
3.2.1	Amplification de la séquence de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcine.....	131
3.2.2	Séquence partielle de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcine.....	131
3.2.3	Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène <i>PN1</i> chez les autres espèces.....	138
3.2.4	Comparaison entre les séquences en acides aminés du gène <i>PN1</i> chez le porc, l'humain, le bovin, la souris et le rat.....	138
3.2.5	Stratégies de clonage des séquences génomiques 5' du gène <i>PN1</i> porcine.....	147
3.2.6	Séquence de 3,4kb de la région promotrice du gène <i>PN1</i> porcine.....	147
3.2.7	Comparaison des séquences promotrices du gène <i>PN1</i> chez le porc, l'humain et la souris.....	150
3.2.8	Recherche de sites potentiels de liaison de facteurs de transcription.....	150
3.2.9	Études de co-transfections du promoteur du gène <i>PN1</i> dans les cellules CV-1.....	161
3.3	GÈNE <i>FGF9</i> PORCIN.....	161
3.3.1	Amplification de la séquence de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcine.....	161
3.3.2	Séquence partielle de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcine.....	166
3.3.3	Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène <i>FGF9</i> chez les autres espèces.....	166
3.3.4	Comparaison entre les séquences en acides aminés du gène <i>FGF9</i> chez le porc, l'humain, la souris et le rat.....	175
4	DISCUSSION.....	178
4.1	MISE EN PLACE DES OUTILS MOLÉCULAIRES.....	179
4.1.1	Clonage des séquences codantes porcines des gènes <i>VNNI</i> , <i>PN1</i> et <i>FGF9</i> ...	180

4.1.2	Stratégies de clonage des séquences 5'flanquantes des gènes <i>VNN1</i> , <i>PN1</i> et <i>FGF9</i> porcin	181
4.2	CARACTÉRISATION DES SÉQUENCES CODANTES ET DES SÉQUENCES EN ACIDES DES GÈNES <i>VNN1</i> , <i>PN1</i> ET <i>FGF9</i>	182
4.2.1	Comparaison de l'homologie des séquences du gène <i>VNN1</i> chez différentes espèces.....	182
4.2.2	Comparaison de l'homologie des séquences du gène <i>PN1</i> chez différentes espèces.....	183
4.2.3	Comparaison de l'homologie des séquences du gène <i>FGF9</i> chez différentes espèces.....	184
4.3	COMPARAISON DES SÉQUENCES 5'FLANQUANTES DES GÈNES <i>VNN1</i> ET <i>PN1</i> ENTRE LES ESPÈCES.	185
4.4	ÉTUDE DE RÉGULATION DES GÈNES <i>VNN1</i> ET <i>PN1</i> PORCINS DANS LES CELLULES CV-1	188
4.4.1	Effet contradictoire de Gata4 murin sur la régulation des gènes <i>VNN1</i> et <i>PN1</i> porcin	189
4.4.2	Effet de SOX9 sur la régulation des gènes <i>VNN1</i> et <i>PN1</i> porcin	189
4.4.3	Le facteur SOX9 porcin inhibe la transactivation du gène <i>PN1</i> porcin produit par le facteur GATA4.....	190
4.4.4	Comparaison de l'effet du facteur SOX9 sur les promoteurs <i>VNN1</i> porcin, humain et murin.....	191
5	CONCLUSION.....	194
6	PERSPECTIVES.....	197
7	RÉFÉRENCES.....	199

LISTE DES TABLES

		Page
Table I	Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène <i>VNN1</i> porcin.	52
Table II	Séquences d'amorces diverses utilisées pour le clonage et le séquençage des genes <i>VNN1</i> , <i>PN1</i> et <i>FGF9</i> .	59
Table III	Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène <i>PN1</i> porcin.	77
Table IV	Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène <i>FGF9</i> porcin.	86
Table V	Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène <i>VNN1</i> chez différentes espèces de mammifères.	102
Table VI	Pourcentages de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine VANIN-1 qui découlent de la séquence codante du gène <i>VNN1</i> chez différentes espèces de mammifère.	105
Table VII	Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène <i>PN1</i> chez différentes espèces de mammifères.	143
Table VIII	Pourcentages de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine NEXIN-1 qui découlent de la séquence codante du gène <i>PN1</i> chez différentes espèces de mammifères.	145
Table IX	Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène <i>FGF9</i> chez différentes espèces de mammifères.	173
Table X	Pourcentage de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine FGF9 qui découlent de la séquence codante du gène <i>FGF9</i> chez différentes espèces de mammifères.	176

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1	Modèle de la détermination/différenciation du sexe chez les mammifères.	41
Figure 2	Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène <i>VNN1</i> porcin.	92
Figure 3	Séquence complète de la séquence codante du gène <i>VNN1</i> porcin.	95
Figure 4	Séquence en acides aminés de la protéine VANIN-1 porcine déduite de la séquence codante du gène <i>VNN1</i> porcin.	98
Figure 5	Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène <i>VNN1</i> porcin.	100
Figure 6	Illustration de la première stratégie utilisée pour le clonage du premier fragment d'ADN génomique (1,9kb) de séquences 5' flanquantes du gène <i>VNN1</i> porcin.	107
Figure 7	Illustration de la stratégie qui a permis le clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique (3,3kb) de séquences 5' flanquantes en amont du premier fragment génomique de 1,9kb du gène <i>VNN1</i> porcin.	109
Figure 8	Séquence de 5,15kb de la région promotrice du gène <i>VNN1</i> porcin directement en amont du codon du début de la transcription (ATG).	112
Figure 9	Comparaisons entre les séquences 5'flanquantes du gène <i>VNN1</i> chez le porc, l'humain et la souris.	119
Figure 10	Sites de reconnaissance potentiels de facteurs de transcription impliqués lors de la détermination du sexe sur le promoteur du gène <i>VNN1</i> chez différentes espèces.	121
Figure 11	Effet d'inhibition sur les séquences 5'flanquantes du gène <i>VNN1</i> porcin par le facteur Gata4 murin.	125
Figure 12	Effet de transactivation de la séquence porcine 5'flanquante du gène <i>VNN1</i> par les facteurs SOX9 porcin et murin.	127
Figure 13	Effet des facteurs SOX9 porcin et Sox9 murin sur les séquences 5'flanquantes des gènes <i>VNN1</i> porcin (A), humain (B) et murin (C).	129

		Page
Figure 14	Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène <i>PN1</i> porcin.	132
Figure 15	Séquence complète de la séquence codante du gène <i>PN1</i> porcin.	134
Figure 16	Séquence en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine déduite de la séquence codante du gène <i>PN1</i> porcin.	139
Figure 17	Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène <i>PN1</i> porcin.	141
Figure 18	Illustration de la stratégie qui a permis le clonage de 3,4kb de séquence 5'flanquante du gène <i>PN1</i> porcin.	148
Figure 19	Séquence de 3,4kb de région promotrice du gène <i>PN1</i> porcin directement en amont du codon du début de la transcription (ATG).	151
Figure 20	Comparaisons entre les séquences 5'flanquantes du gène <i>PN1</i> chez le porc, l'humain et la souris.	156
Figure 21	Sites de reconnaissance potentiels de facteurs de transcription impliqués lors de la détermination du sexe sur le promoteur du gène <i>PN1</i> chez différentes espèces.	158
Figure 22	A) Effet de transactivation de la séquence porcine 5'flanquante du gène <i>PN1</i> par le facteur Gata4 murin. B) SOX9 porcin n'a aucun effet direct sur les séquences 5'flanquantes du gène <i>PN1</i> porcin. C) Effet inhibiteur du facteur SOX9 porcin sur la transactivation du promoteur <i>PN1</i> porcin exercée par le facteur Gata4 murin.	162
Figure 23	Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène <i>FGF9</i> porcin.	164
Figure 24	Séquence complète de la séquence codante du gène <i>FGF9</i> porcin.	167
Figure 25	Séquence en acides aminés de la protéine FGF9 porcine déduite de la séquence codante du gène <i>FGF9</i> porcin.	169
Figure 26	Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène <i>FGF9</i> porcin.	171

ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations couramment utilisées dans le texte

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AgeI : enzyme de restriction

AHC : «Adrenal hypoplasia congenita»

AMH : «Anti-mullerian hormone»

ApaI : enzyme de restriction

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATG : codon du début de la transcription

ATP : adénosine triphosphate

BamHI : enzyme de restriction

BSA : « bovine serum albumin »

C : cytosine

°C : degré Celsius

ClaI : enzyme de restriction

CMVp : promoteur du cytomégalovirus

CV-1 : fibroblastes de rein de Singe Vert

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

dGTP : désoxyguanine triphosphate

DAX-1 : «DSS-AHC critical region on the X chromosome»

DMEM : milieu «Dubelco's Modified Eagle Medium»

DMRT1 : «Doublesex and mab-3 related transcription factor 1»

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

D.O. : densité optique

DraI : enzyme de restriction

dTTP : désoxythymidine triphosphate
DSS : «Dosage sensitive sex reversal»
e ou E : embryonnaire
EcoRI : enzyme de restriction
EcoRV : enzyme de restriction
FACS : cytomètre de flux
FGF9 : «Fibroblast growth factor 9»
FOG2 : «Friend of GATA 2»
FSH : «Follicle-stimulating hormone»
GFP : «Green fluorescent protein»
GPI : glycosylphosphatidylinositol
HaeIII : enzyme de restriction
HCl : chlorure d'hydrogène
HindIII : enzyme de restriction
HMG : «High mobility group»
HSP : «Heat shock protein 70»
InsI3 : «Insulin-like peptide 3»
IPTG : isopropyl-β-D-galactopyranoside
j/cm² : joules par cm²
K : séquences «Kozak»
kb : kilobases
KpnI : enzyme de restriction
LB : milieu « Luria Broth »
LH : «Luteinizing hormone»
LHX : «LIM homeobox domain»
Lys : lysine
M : molaire
Mb : mégabase
MgCl₂ : chlorure de magnésium
Mg(Oac)₂ : acétate de magnésium
MIS : «Mullerian inhibiting substance»
ml : millilitre
MluI : enzyme de restriction

NaCl : chlorure de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
NBS : «Newborn bovine serum»
ng : nanogramme
NLS : «Nuclear localisation signal»
nm : nanomètre
NotI : enzyme de restriction
pb : paire de bases
PBS : «phosphate buffer saline»
PC4 : «Positive coactivator 4»
PCR : «Polymerase chain reaction»
PDZ : «PSD-95, Disc large and Zo-1»
pEGFP-1 : vecteur d'expression (Clontech)
pGEM®-T : vecteur de clonage (Promega)
PN-1 : Protéase Nexin-1
PstI : enzyme de restriction
PvuII : enzyme de restriction
RbCl₂ : chlorure de rubidium
RNase : enzyme de dégradation de l'ARN
rpm : rotations par minute
RT : «Reverse transcription»
SacII : enzyme de restriction
Sall : enzyme de restriction
SDS : sodium dodecyl sulfate
Ser : sérine
SIP-1 : «SRY interacting protein 1»
SF-1 : «Steroidogenic factor 1»
SOX : «SRY-related HMG box»
SpeI : enzyme de restriction
SRY : «Sex-determinating region-Y chromosome»
SSC : tampon citrate de sodium
StuI : enzyme de restriction
T4 DNA ligase : enzyme de ligation

TDF : «Testis determinating factor»

TdT : enzyme de modification

TE : tampon Tris-EDTA

Thr : thréonine

U : unité

µg : microgramme

µl : microlitre

µM : micromolaire

VNN-1 : «Vascular non-inflammatory molecule 1 »

WT-1 : «Wilm's tumor gene 1»

XbaI : enzyme de restriction

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

XhoI : enzyme de restriction

% : pourcentage

DÉDICACES

À ma tante Suzie...

REMERCIEMENTS

Je tiens sincèrement à remercier le Dr David W. Silversides pour m'avoir accueilli dans son laboratoire dans le cadre de mon projet de maîtrise. En plus d'être un bon directeur de recherche, il a été pour moi un bon professeur, un bon conseiller personnel et professionnel et un bon ami. Je crois que c'est très rare de retrouver toutes ces qualités chez un directeur de recherche. Un gros merci pour tout et j'espère continuer à collaborer avec vous dans l'avenir.

Un merci tout spécial à ceux qui ont contribué de près ou de loin à mon projet de recherche par leur conseils, leur soutien et leur amitié: Dr Jacques G. Lussier, Isabelle Daneau, Nicolas Pilon, Alexandre Boyer, Tania Fayad, Nicolas Gévry et Micheline Sicotte.

Je voudrais remercier mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ont misé sur moi sans condition. Vous m'avez ouvert toutes les portes, vous m'avez permis de réaliser mes rêves, de m'épanouir et j'en serai toujours très reconnaissante. Merci de m'avoir donné une belle et bonne vie, je vous aime beaucoup!

Je ne voudrais pas oublier de remercier mon amoureux et meilleur ami, Bernard Taylor. Il a su me supporter par son amour et ses farces plates tous le long de mes études. Merci d'avoir été si compréhensif avec moi, même si des fois je n'étais pas vraiment compréhensible! Maintenant que c'est terminé, il est temps pour nous de nous tourner vers l'avenir. J'espère que tu seras toujours à mes côtés! Je t'aime! XXX

Finalement, un gros merci à tous ceux que j'aime et qui ont fait de ce mémoire... le mémoire d'une jeune folle!

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

1.1 LA REPRODUCTION SEXUÉE ET LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES ANIMAUX

Étant donné la prédominance de la méiose et de la reproduction sexuée dans les systèmes biologiques, la très grande majorité des animaux ont besoin de s'accoupler pour se reproduire. La plupart du temps, cela nécessite la présence d'individus mâles et d'individus femelles. Cependant, les mécanismes régissant le développement sexuel des individus peuvent différer d'une espèce à l'autre. Dans la nature, il existe au moins trois types de détermination sexuelle.

1.1.1 La détermination sexuelle environnementale

Certaines espèces ont un patron génétique identique entre les sexes, mais ils dépendent de signaux externes environnementaux pour contrôler leur phénotype sexuel. En effet, ils utilisent des facteurs environnementaux pour déterminer le sexe de la nouvelle progéniture comme la température, le pH ou encore le ratio mâle:femelle de la population (Haqq et Donahoe, 1998). Chez certains poissons, le phénotype sexuel est façonné à l'âge adulte par un groupe dynamique de stimuli comme les hormones et les signaux visuels (Francis *et al.*, 1993). Chez plusieurs reptiles (alligators et tortue), le phénotype sexuel dépend de la température d'incubation des œufs fertilisés (Pieau *et al.*, 1996).

1.1.2 La détermination sexuelle dose-dépendante

Chez certaines espèces, les différences génétiques entre les sexes procurent un moyen interne de régulation de la détermination du sexe. Dans cette catégorie, la détermination du sexe peut être contrôlée par des mécanismes de dosage compensatoire ou par la présence d'un gène dominant situé souvent sur un chromosome hétérogamétique. La

mouche *Drosophila melanogaster* dépend d'un processus dosage compensatoire (résumé par Lalli *et al.*, 2003). Les mouches homogamétiques XX sont femelles et les mouches hétérogamétiques XY sont mâles. Le déclenchement de la détermination du sexe est contrôlé par le ratio de chromosomes X par rapport aux autosomes (A). Un ratio de X/A égal à 1 produit des femelles et un ratio X/A égal à 0,5 produit des mâles. Ainsi, même si *D.melanogaster* mâle possède un chromosome Y, il est inutile pour la détermination du sexe parce que les individus XO sont mâles stériles et les individus XXY sont femelles. La valeur du ratio de X/A détermine le sexe via un petit nombre de gènes régulateurs. La cascade des gènes impliqués contrôle simultanément l'activation du chromosome X, le phénotype sexuel somatique et le développement des gonades. Chez *D.melanogaster*, la plupart des gènes deviennent actifs ou inactifs selon le sexe par un épissage alternatif (résumé par Lalli *et al.*, 2003).

Chez les nématodes *C.elegans*, l'identité sexuelle est déterminée par l'activité de plusieurs gènes qui interagissent dans une cascade de régulation complexe. Cette cascade contrôle non seulement les traits sexuels, mais aussi le niveau d'expression des gènes du chromosome X lors du processus de dosage compensatoire (Cline *et al.*, 1996). Les animaux XX deviennent des hermaphrodites et les animaux XO deviennent mâles (Madl *et al.*, 1979). Au tout début du développement, le ratio X/A contrôle l'activité du gène *xol-1*, un gène clé qui contrôle la détermination du sexe et le dosage compensatoire. Lors de l'embryogenèse, une activité élevée de la protéine XOL-1 déclenche le développement mâle alors qu'une faible activité provoque le développement hermaphrodique (Rhind *et al.*, 1995).

1.1.3 La détermination sexuelle causée par la présence d'un gène dominant

Les mammifères euthériens et les oiseaux font partie du système gène dominant pour la détermination sexuelle. Chez les oiseaux, les mâles sont homogamétiques (ZZ) et les femelles sont hétérogamétiques (ZW). Ce sont les femelles qui déterminent le sexe de la

progéniture (Bull *et al.*, 1974). Chez les mammifères, c'est le phénomène contraire, ce sont les mâles qui déterminent le sexe des rejetons. Les femelles portent deux chromosomes X (XX) et les mâles portent un seul chromosome X et un chromosome Y (XY). Ainsi, la détermination du sexe est contrôlée par un effet dominant du chromosome W chez les oiseaux et du chromosome Y chez les mammifères. Cet effet s'exerce quel que soit le nombre de chromosomes X ou Z associés. Alors, si un individu possède le génotype XXXY, on observera un phénotype mâle alors qu'un individu ayant le génotype XO se développera en femelle (Ford *et al.*, 1959 ; Jacobs *et al.*, 1959).

Dans les années 40, les études d'Alfred Jost dont les travaux ont permis d'établir les concepts fondamentaux de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères ont appuyé l'hypothèse de l'existence d'un gène dominant sur le chromosome Y qui déclencherait la détermination du sexe. Par la castration *in utero* des gonades de lapins avant leur différenciation, il a pu observer que tous les embryons (XX et XY) développaient un système reproducteur femelle et qu'aucun développement n'était observé au niveau des canaux de Wolff (Jost, 1947). Les ovaires n'étaient donc pas nécessaires pour le développement des canaux de Müller et la voie de développement femelle semblait être la voie du développement sexuel par défaut. Aussi, les expériences de Jost démontraient que le développement des canaux de Wolff et la régression des canaux de Müller dépendaient de substances produites et sécrétées par les testicules en développement chez les mammifères euthériens. En absence du gène dominant sur le chromosome Y, les ovaires se développent à partir des gonades bipotentielles, ainsi que les caractéristiques secondaires femelles. Ce gène dominant hypothétique a été appelé « facteur qui détermine les testicules » ou TDF (testis determinating factor).

1.2 LA RECHERCHE DU TDF

Le gène TDF sur le chromosome Y a été localisé à l'aide d'ADN de patients qui portaient seulement certaines parties du chromosome Y. Des femmes qui avaient un caryotype XY ont été répertoriées et elles possédaient pratiquement toutes un chromosome

Y qui manquait une petite région qui encodait le TDF. Inversement, des hommes qui avaient un caryotype XX ont été décrits comme ayant une addition d'une petite portion du chromosome Y qui portait le gène TDF sur un de leur chromosome X (Page *et al.*, 1987). En fait, ce petit morceau correspondait à la région proximale de la région pseudoautosomale du petit bras du chromosome Y, Yp (Page *et al.*, 1987). En utilisant une stratégie de clonage positionnel sur ce petit morceau de chromosome Y, il a été possible d'isoler un gène dans cette région : le gène *SRY* (Sex-determining region-Y) (Sinclair *et al.*, 1990). La présence ou l'absence du gène *SRY* corrélait avec les phénotypes de réversion de sexe : *SRY* était détectable chez un pourcentage des individus 46-XX qui possédaient un phénotype mâle et il était absent chez certains individus 46-XY avec un phénotype femelle. De plus, des mutations qui empêchaient l'expression du gène *SRY* ont été identifiées chez certaines femelles 46-XY (Jager *et al.*, 1990 ; Berta *et al.*, 1990). Finalement, la meilleure preuve montrant que *SRY* est effectivement le TDF est venue de l'analyse de souris transgéniques qui portaient dans leur génome un fragment de 14kb du transgène *SRY* (Koopman *et al.*, 1991). Chez environ 30% des lignées, les souris XX avaient développé des testicules et les autres structures reproductives masculines et elles démontraient des comportements d'accouplement mâles normaux. Ces mâles XX étaient toutefois stériles. Des analyses histologiques ont démontré la présence de cellules de Sertoli, de cellules de Leydig et de cellules myoïdes, mais l'absence de cellules en spermatogénèse. Le fait que cet inversement de sexe n'ait pas été observé chez 100% des lignées avait été expliqué par les différents sites d'intégration du transgène.

1.3 ORIGINE ET DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES

1.3.1 Les crêtes génitales

Suite à la gastrulation et aux courbures du disque embryonnaire, les ébauches des gonades apparaissent chez l'embryon de mammifère sous la forme d'une crête

longitudinale bilatérale située de chaque côté de la ligne médiane, entre le mésonéphros et le mésentère dorsal. Ces crêtes sont appelées les crêtes génitales. Les crêtes génitales sont formées suite à une prolifération de l'épithélium coelomique et à une condensation du mésenchyme sous-jacent (Langman *et al.*, 1996). Chez la souris, les crêtes génitales se développent au jour e10 chez le porc au jour e21 et chez l'humain à la quatrième semaine de développement du fœtus. À ce stade, les cellules germinales ne sont toujours pas présentes dans les crêtes génitales.

1.3.2 Les cellules primordiales germinales

Autant chez la souris, le porc ou l'humain, les cellules germinales apparaissent à un stade précoce du développement avant la formation des crêtes génitales. Chez la souris, elles sont retrouvées primitivement dans le mésoderme extraembryonnaire à la base de la vésicule vitelline au jour e7,5 (Ginsburg *et al.*, 1990). Elles forment un groupe distinct d'environ 75 cellules à l'étape pré-somite (Hogan *et al.*, 1994). Au jour e8,0, les cellules germinales primordiales se mettent à migrer activement le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur et elles envahissent les crêtes génitales en formation autour des jours e11-e11,5. Aussi, aux environs du jour e13,0, grâce à des divisions toutes les 16 heures, environ 25 000 cellules primordiales germinales auront colonisé chaque crête génitale (Hogan *et al.*, 1994). Chez l'embryon humain, c'est à la sixième semaine de développement que les cellules germinales pénètrent dans les crêtes génitales (Langman *et al.*, 1996).

1.3.3 Les gonades indifférenciées

Peu avant et pendant l'arrivée des cellules germinales primordiales dans les crêtes génitales, l'épithélium coelomique prolifère activement et envahit le mésenchyme sous-jacent. Chez la souris, au jour e12,0, les cellules épithéliales se multiplient pour former un certain nombre de cordons de forme irrégulière : les cordons sexuels primitifs. Ces cordons primitifs entourent progressivement les cellules de Sertoli et les cellules germinales

primordiales dans le mésenchyme (Colvin *et al.*, 2001). Dans les deux sexes, ces cordons restent en connexion avec la surface épithéliale et, à ce stade du développement, il est impossible de distinguer la gonade mâle de la gonade femelle.

1.3.4 Les gonades bipotentielles

Les gonades bipotentielles possèdent les quatre types cellulaires précurseurs qui serviront à former soit les testicules, soit les ovaires. Il y a les cellules germinales, les cellules de support, les cellules stéroïdogéniques et les cellules du tissu conjonctif. Dans les gonades bipotentielles, les cellules germinales primordiales qui proviennent de la paroi de la vésicule vitelline ont migré et envahi les crêtes génitales. Parallèlement à sa prolifération dans le mésenchyme sous-adjacent, l'épithélium coelomique de la crête génitale se différencie en cellules de support bipotentielles (Karl *et al.*, 1998). En ce qui concerne les cellules mésenchymateuses de la gonade en développement, elles se différencient en cellules du tissu conjonctif et en cellules stéroïdogéniques (Buehr *et al.*, 1993 ; Martineau *et al.*, 1997). Dans les gonades différenciées, les cellules de support bipotentielles donneront naissance aux cellules de Sertoli dans les gonades mâles et aux cellules de la granulosa dans les gonades femelles (Albrecht *et al.*, 2001). Les cellules du tissu conjonctif deviendront les cellules péritubulaires myoïdes, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules myoépithéliales dans les testicules tandis que dans les ovaires, elles deviendront les cellules stromales. Les cellules stéroïdogéniques se transformeront en cellules de Leydig chez le mâle et en cellules de la thèque chez la femelle. Finalement, les cellules germinales primordiales donneront les pro-spermatogonies chez le mâle et les ovocytes chez la femelle.

1.3.5 Les testicules

Chez les mammifères mâles, *SRY* est le gène situé sur le chromosome Y qui est nécessaire et suffisant pour induire le développement des testicules (Sinclair *et al.*, 1990 ;

Koopman *et al.*, 1991). La délétion du gène *Sry* produit des souris femelles XY (Lovell-Badge et Robertson, 1990 ; Gubbay *et al.*, 1992), tandis que l'ajout d'un transgène *Sry* produit des mâles XX (Koopman *et al.*, 1991). À ce jour, il y a quatre événements cellulaires mâle-spécifique responsables du développement normal des testicules : la prolifération cellulaire, la différenciation des cellules épithéliales coelomiques en lignée de cellules de Sertoli, la migration cellulaire mésonephrique et la vascularisation. Toutes ces voies cellulaires dépendent de l'expression de *SRY* dans les crêtes génitales.

1.3.5.1 La prolifération des précurseurs des cellules de Sertoli et la différenciation en cellules de Sertoli

Lors de la formation des testicules, une augmentation de la prolifération de l'épithélium coelomique de la gonade se produit entre les jours e11,3 et e12,1 chez la souris (Schmahl *et al.*, 2000). Avant le jour e11,5, la prolifération donne naissance aux précurseurs des cellules de Sertoli et à des cellules interstitielles encore non identifiées (Karl *et al.*, 1998). Après le jour e11,5, les cellules de l'épithélium coelomique contribuent encore aux gonades XY, mais elles donnent seulement des cellules interstitielles non identifiées. La prolifération des cellules de l'épithélium coelomique serait dépendante de l'expression de *SRY*. En effet, le patron de prolifération des gonades XX de souris porteuses du transgène *Sry* a été examiné et trouvé identique au patron des gonades XY (Schmahl *et al.*, 2000). Inversement, les gonades XY provenant des souris B6XYpos qui deviennent des ovaires ou des ovotesticules démontrent un niveau de prolifération similaire aux gonades XX. Néanmoins, de récentes études d'expression ont démontré que *SRY* n'était pas exprimé dans les cellules épithéliales coelomiques (Bullejos *et al.*, 2001). Ainsi, il a été suggéré que les précurseurs des cellules de Sertoli qui expriment *SRY* dans le voisinage de l'épithélium coelomique seraient capables d'élargir leur population en recrutant d'une façon non cellulaire et autonome les cellules de l'épithélium coelomique qui n'expriment pas *SRY* en lignée de Sertoli (Tilman *et al.*, 2002).

1.3.5.2 La migration des cellules mésonephriques

Les cellules migratoires provenant du mésonéphros sont représentées par au moins trois lignées de cellules : les cellules péritubulaires myoïdes, les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires (Martineau *et al.*, 1997). Des expériences ont démontré qu'elles contribuaient à la formation des gonades XY et que la culture des gonades XY sans leur mésonéphros adjacent empêchait la formation des cordons testiculaires (Buehr *et al.*, 1993 ; Merchant-Larios *et al.*, 1993). Les cellules migrent dans les gonades XY entre les jours e11,5 et au moins e16,5, mais pas dans les gonades XX. La migration cellulaire à partir du mésonéphros adjacent serait un des premiers événements induits par *SRY* et elle jouerait un rôle dans la formation des cordons testiculaires. En effet, des expériences ont montré que la migration des cellules mésonéphriques ne se faisait pas dans les gonades XY chez des souris qui n'exprimaient pas *Sry*. De façon contraire, les gonades XX qui portent le transgène *Sry* et qui forment des testicules sont capables de recruter les cellules à partir du mésonéphros (Capel *et al.*, 1999). Des interactions entre les cellules migratoires du mésonéphros et les précurseurs des cellules de soutien auraient un rôle important à jouer dans l'établissement de la destinée des cellules de Sertoli. Des expériences ont démontré que la migration des cellules mésonéphriques était capable d'induire la différenciation des cellules de Sertoli en absence de *SRY* chez les précurseurs des cellules de soutien (Tilman *et al.*, 1999).

1.3.5.3 La vascularisation

Jusqu'au jour e11,5, la vascularisation primitive est identique dans les crêtes génitales XX et XY. À partir du jour e12,5, les gonades XY développent une vascularisation distincte. Elle se caractérise par le développement d'un large vaisseau coelomique juste au-dessous de l'épithélium coelomique. Cette réorganisation de la vascularisation coïncide avec l'expression de *SRY* et la formation des cordons testiculaires. Des expériences de gonades en culture ont montré que peu de temps après le début de l'expression de *SRY*, les gonades XY recrutent un grand nombre de cellules endothéliales provenant du mésonéphros adjacent, un mécanisme totalement absent dans le cas des gonades XX (Capel *et al.*, 2002). Ces cellules endothéliales migratoires ne contribuent pas au développement veineux ou lymphatique, mais plutôt au système artériel. Cette nouvelle

formation du système artériel établirait un nouveau patron de flux sanguin dans les gonades XY qui pourrait être impliqué dans l'exportation de la testostérone dans le but de masculiniser les embryons XY (Capel *et al.*, 2002).

Grâce aux événements de migration, prolifération et différenciation cellulaire spécifiques chez les mâles, les cordons sexuels primitifs se transforment graduellement pour former une série de cordons cellulaires bien distincts désormais appelés cordons testiculaires. Les cordons testiculaires sont constitués de cellules de Sertoli qui dérivent de l'épithélium coelomique (Karl et Capel., 1998) et de cellules germinales entourées d'une membrane basale faites de cellules péritubulaires myoïdes (Nordqvist, 1995). Par la suite, les cordons testiculaires perdent leur connexion avec l'épithélium superficiel et ils en sont alors séparés par une structure fibreuse appelée la tunique albuginée (Langman et Sadler, 1996). Dans l'espace interstitiel qui entoure les cordons testiculaires, on retrouve les cellules stéroïdogéniques de Leydig et les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins qui se développent. Ainsi, au jour e12,5, les gonades mâles peuvent être facilement distinguées des gonades femelles, non seulement par leur grosseur et par la présence des cordons testiculaires composés de cellules de Sertoli exprimant le gène *MIS*, mais aussi par leur haut degré de vascularisation et par l'expression de la testostérone par les cellules de Leydig (Nordqvist, 1995).

1.3.6 Les ovaires

Lorsque l'embryon est génétiquement féminin, c'est-à-dire lorsqu'il ne possède pas le gène *SRY* dû à l'absence du chromosome Y, les gonades bipotentielles prennent la voie de la différenciation en ovaires. En absence de *SRY*, les précurseurs des cellules de support suivent la voie ovarienne et deviennent éventuellement des cellules folliculaires. La morphologie des ovaires en développement demeure longtemps similaire à celle des gonades indifférenciées et la première indication que ce sont des gonades femelles n'apparaît qu'au jour e13,5 chez la souris, au moment où les cellules germinales commencent à entrer en méiose (Nordqvist, 1995). Contrairement aux testicules, les ovaires

ont une apparence amorphe et démontrent très peu d'organisation structurale. Au niveau des ovaires en développement, les cordons sexuels primitifs se segmentent en amas cellulaires irréguliers. Ces amas contenant des îlots de cellules germinales (gonocytes) sont situés dans la zone médullaire de l'ovaire. Plus tard, ils seront remplacés par un stroma vasculaire qui constitue la zone médullaire de l'ovaire (Langman et Sadler, 1996). De plus, contrairement aux gonades mâles, l'épithélium superficiel de l'ovaire demeure épais et il continue à proliférer pour donner naissance à une deuxième génération de cordons appelés cordons sexuels corticaux. Ces cordons pénètrent dans le mésenchyme, mais sans vraiment s'éloigner de l'épithélium superficiel (Langman et Sadler, 1996). Les cordons corticaux seront à leur tour segmentés en amas cellulaires contenant une ou plusieurs cellules germinales (gonocytes) qui se transformeront ensuite en ovogonies alors que les cellules épithéliales qui les entourent formeront les cellules folliculaires (Langman et Sadler, 1996). Plusieurs expériences ont démontré que les cellules germinales primordiales sont requises pour la différenciation des cellules folliculaires. En absence des cellules germinales primordiales, les follicules ne se forment jamais (Huang *et al.*, 1993 ; Bedell *et al.*, 1995). Pour leur part, la différenciation des cellules de Sertoli et la formation des cordons testiculaires ne sont pas dépendantes des cellules primordiales germinales. Dans les testicules, en absence des cellules primordiales germinales, les cordons testiculaires se forment normalement. Les cellules germinales primordiales entrent de façon synchronisée en méiose à partir du jour e13,5 en absence de toute interférence de la part des cellules de Sertoli et ce, indépendamment du patron chromosomique (XX ou XY). Dans les ovaires, les cellules germinales arrêtent au stade de la première prophase de la méiose I et elles ne reprennent leur division qu'au début des cycles ovulatoires (McLaren *et al.*, 2000).

1.3.7 La différenciation des voies génitales internes

Tout comme dans le cas des gonades, il est impossible de distinguer les voies génitales internes au tout début du développement des embryons mâle et femelle. Pendant l'étape indifférenciée, les embryons mâles et femelles possèdent deux paires de conduits : les canaux de Müller (canaux paramésonephriques) et les canaux de Wolff (canaux

mésonéphriques). Pour activer la voie de différenciation mâle, les testicules produisent trois hormones différentes qui sont essentielles au développement mâle. La première hormone produite est l'hormone glycoprotéique MIS (Müllerian inhibiting substance), membre de la superfamille des TGF- β . Elle est produite par les cellules de Sertoli dans les cordons testiculaires et cause la régression des canaux de Müller (Munsterberg et Lovell-Badge, 1991). Tout de suite après la sécrétion de MIS, les cellules de Leydig produisent la testostérone qui maintient les canaux de Wolff et développe les organes génitaux externes mâles (Covin *et al*, 2001). Finalement, un peu plus tard durant la gestation, les cellules de Leydig vont aussi produire un membre de la famille des peptides d'insuline, Insl3 (insulin-like peptide 3), qui cause la descente des testicules dans le scrotum (Zimmermann *et al.*, 1999). De façon consistante à leur rôle dans le développement des testicules, MIS, Insl3 ou les enzymes stéroïdogéniques qui produisent la testostérone ne sont pas présents dans les ovaires fœtaux. De plus, il semble que la synthèse de la testostérone est activement réprimée par la présence de la molécule de signalisation WNT-4 lors des étapes embryonnaires du développement femelle (Vanio *et al.*, 1999). Ainsi, en absence de ces trois hormones testiculaires, la différenciation femelle se produit. Sans MIS, les canaux de Müller sont maintenus; sans testostérone, les canaux de Wolff dégénèrent et les organes génitaux externes femelles se développent par défaut ; sans Insl3, les gonades restent dans l'abdomen.

Chez le mâle, chaque canal de Wolff va se différencier en vésicules séminales, en épидидyme et en canal déférent. De plus, la sécrétion de la testostérone permettra le développement des organes génitaux externes comme le pénis et le scrotum (Langman et Sadler, 1996). Le développement des organes génitaux externes chez le mâle est induit par la dihydrotestostérone (DHT) qui est produite à partir de la testostérone grâce à l'action de l'enzyme 5 α -réductase dans les tissus cibles. Chez la femelle, les canaux de Müller vont se fusionner pour former le canal utéro-vaginal dont la différenciation permettra la formation des trompes de Fallope, de l'utérus et de la partie supérieure du vagin. Parallèlement, il y aura déclenchement de la formation des organes génitaux externes comme le clitoris, les grandes lèvres, les petites lèvres et la partie inférieure du vagin (Langman et Sadler, 1996). Les facteurs contrôlant la différenciation du canal de Müller sont très mal connus. Il a été

suggéré que les oestrogènes maternels et placentaires ainsi que les oestrogènes sécrétés par l'ovaire fœtal jouent un rôle dans ce processus (Langman et Sadler, 1996). De plus, il a aussi été démontré que la molécule de signalisation WNT-4 était nécessaire au développement des canaux de Müller (Vainio *et al.*, 1999).

1.4 DESCRIPTION DES GÈNES ESSENTIELS AU DÉVELOPPEMENT DES GONADES CHEZ LES MAMMIFÈRES

1.4.1 Le gène *SRY*

Le gène *SRY* (Sex-determining Region-Y chromosome) est le gène clé qui déclenche le développement des testicules chez les mammifères (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990). Il est le seul gène lié au chromosome Y nécessaire et suffisant pour lancer le programme du développement des testicules. Des mutations de ce gène chez l'homme ou la délétion de ce gène chez les souris mâles *Ytdym1* (Gubbay *et al.*, 1992 ; Lovell-Badge et Robertson, 1990) provoquent des cas de réversion de sexe mâle vers femelle. Inversement, la présence du gène *SRY* chez des souris transgéniques génétiquement femelle XX (Koopman *et al.*, 1991; Eicher *et al.*, 1995) cause l'initiation du développement des testicules et une réversion de sexe complète femelle vers mâle.

Chez la souris, l'expression de *Sry* est restreinte au niveau des crêtes génitales et débute au jour e10,5. L'expression atteint un maximum au jour e11,5 pour finalement se terminer au jour e12,5 (Hacker *et al.*, 1995 ; Bullejos et Koopman, 2001 ; Bergstrom *et al.*, 2000). *Sry* apparaît en une vague dynamique d'expression qui émane des régions centrales et/ou antérieures, qui s'étend de façon subséquente aux deux pôles et qui termine au pôle caudal des crêtes génitales (Bullejos et Koopman, 2001). Récemment, des transcrits linéaires de *Sry* ont aussi été observés au niveau du cerveau chez les embryons de souris (Mayer *et al.*, 2000). Chez la souris adulte, des transcrits circulaires non-traduits sont détectés dans les cellules germinales au niveau des testicules (Koopman *et al.*, 1990 ; Capel *et al.*, 1993). Chez le porc, l'expression de *SRY* a été trouvée dans les crêtes génitales

indifférenciées au moins à partir du jour e21, pour atteindre son maximum au jour e23 (Daneau *et al.*, 1996). Les transcrits de *SRY* sont toujours détectables au jour e52 (Parma *et al.*, 1999). Chez l'humain, *SRY* n'est pas contrôlé de façon aussi étroite que chez la souris ; des transcrits de *SRY* sont trouvés au niveau de nombreux tissus adultes et fœtaux en plus des testicules (Clépet *et al.*, 1993). Dans les crêtes génitales humaines, *SRY* est détecté pour la première fois entre les jours 41 et 44 post-ovulation et son expression est maximale au jour 44 post-ovulation (Hanley *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui se passe chez la souris, *SRY* humain continue à être exprimé dans les gonades jusqu'au stade adulte (Hanley *et al.*, 2000).

La protéine *SRY* possède un domaine conservé de 79 acides aminés appelé boîte HMG (High Mobility Group) (Sinclair *et al.*, 1990). Ce domaine est caractéristique aux protéines HMG, une famille de facteurs de transcription qui activent (ou inhibent) la transcription des gènes en liant et en repliant l'ADN (Kamachi *et al.*, 2000). Des mutations dans le gène *SRY* ou dans ses régions flanquantes ont été répertoriées chez des patients 46,XY qui souffraient de réversion de sexe complète ou partielle. Plus de 30 mutations ont été identifiées dans le cadre de lecture ouvert du gène *SRY* et toutes ces mutations sauf une se retrouvent au niveau de la boîte HMG, confirmant ainsi l'importance fonctionnelle de cette région chez la protéine *SRY* (Veitia *et al.*, 1997).

La région de la boîte HMG est hautement conservée entre les différentes espèces de mammifères. La comparaison des séquences en acides aminés du domaine HMG de *SRY* chez l'humain, la souris, la vache, le porc et le mouton révèle une identité de 70% (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990; Daneau *et al.*, 1995; Daneau *et al.*, 1996; Payen *et al.*, 1996). Par contre, les séquences en dehors de ce domaine possèdent très peu d'homologie entre les espèces, tant au niveau des nucléotides qu'au niveau des acides aminés. Par exemple, la région riche en glutamine située au bout 3' de la boîte HMG de la protéine *Sry* de souris est absente chez la protéine *SRY* humaine. Cette région permet à la protéine *Sry* murine d'activer l'expression d'un gène rapporteur cible dans des études faites dans des cellules hétérologues (Dubin et Ostrer, 1994). Lors de cette même étude *in vitro*, la protéine humaine n'active pas l'expression de ce gène rapporteur. *In vivo*, il semble que le domaine

riche en répétition de glutamine de la protéine Sry de souris ait un rôle essentiel lors de la détermination du sexe (Bowles *et al.*, 1999). Des constructions de *Sry* qui n'ont pas ce domaine sont incapables d'induire la formation de testicules chez les embryons XX de souris transgéniques contrairement à la construction *Sry* de type sauvage. Ces études suggèrent que *Sry* pourrait agir via un mécanisme fondamentalement différent chez la souris comparativement aux autres mammifères (Bowles *et al.*, 1999).

Par analogie aux autres facteurs HMG, *SRY* aurait un rôle de facteur de transcription qui se lie à l'ADN pour modifier l'expression de gènes. Des études de liaison ont été réalisées afin de trouver un site de liaison consensus pour la protéine SRY. Ces études ont révélé que SRY pouvait lier le même site que d'autres protéines à boîte HMG comme TCF-1, LEF-1 et les SOX soit A/T A/T CAAA/T G (Harley *et al.*, 1994 ; Van de Wetering *et al.*, 1993 ; Denny *et al.*, 1992 ; Bell *et al.*, 1997). Tout comme les autres facteurs à domaine HMG, *SRY* peut se lier à l'ADN par des intercalations partielles dans le petit sillon et peut aussi se lier à des jonctions quatre voies et à de l'ADN modifié cisplatine (Ferrari *et al.*, 1992 ; Pontiggia *et al.*, 1994 ; Trimmer *et al.*, 1998). Les mutations qui causent la réversion de sexe affectent l'activité normale de la boîte HMG de la protéine SRY en modifiant soit l'affinité de la liaison à l'ADN, soit l'angle du repliement de l'ADN (Pontiggia *et al.*, 1994). L'observation de certaines mutations dans la boîte HMG qui dérangent le bon repliement de l'ADN suggère que SRY agirait en tant qu'organisateur de la structure locale de la chromatine plutôt qu'en tant qu'activateur ou répresseur classique lors de la transcription de gènes (Pontiggia *et al.*, 1994). Dans ce modèle, SRY jouerait un rôle architectural en facilitant l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle à un site donné. À ce jour, aucun gène cible de l'action directe du facteur de transcription SRY n'a été identifié.

De récentes études ont proposé que SRY et d'autres facteurs SOX pourraient jouer un rôle lors de l'épissage des pré-ARNms dans les cellules de mammifères (Ohe *et al.*, 2002). SRY et SOX6 sont retrouvés dans les compartiments des facteurs d'épissage dans le noyau (Misteli, 2000). De plus, il semble que SRY et les autres protéines SOX agiraient lors de l'épissage des pré-ARNms par leurs interactions avec l'ARN. Il existe des

similarités entre le domaine HMG de SRY et le domaine de liaison à l'ARN du petit antigène de l'hépatite delta (Veretnik et Gribskov, 1999). De plus, il a été montré que SRY et SOX6 pouvaient se lier à l'ARN (Lalli *et al.*, 2003). Ainsi, en se liant à l'ARN dans les spliceosomes, SRY et les protéines SOX pourraient induire ses repliements et contrôler les interactions protéine-ARN et les interactions ARN-ARN qui permettent les réarrangements des spliceosomes lors de l'épissage (Steitz, 1992 ; Staley et Guthrie, 1998).

1.4.2 Le gène *SOX9*

SOX9 (SRY-related HMG box 9) est un membre typique de la famille des gènes *SOX* : il est caractérisé par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type boîte HMG et il possède un petit domaine de transactivation. Les gènes *SOX* codent pour des protéines apparentées à SRY par leur boîte HMG. Les gènes de cette famille possèdent plus de 60% d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés de la boîte HMG (Goodfellow et Lovell-Badge, 1993) et au moins 30 gènes de cette famille ont été identifiés à ce jour (Osaki *et al.*, 1999). Le gène *SOX9* a été cloné chez l'humain et la souris par le criblage d'une librairie d'ADNc de testicules dans le cas de l'humain et d'une librairie d'ADNc d'embryons dans le cas de la souris à l'aide d'une sonde constituée du domaine HMG de *SRY* (Denny *et al.*, 1992 ; Wright *et al.*, 1993). Chez l'humain, l'haploinsuffisance du facteur de transcription *SOX9* est associée à un désordre squelettique appelé la dysplasie campomélique. Environ 75% des individus XY affectés par cette maladie développe un phénotype femelle partiel ou complet (Mansour *et al.*, 1995). Plus récemment, deux groupes ont aussi rapporté des cas d'inversement de sexe XX mâle sans *SRY* et impliquant *SOX9* chez l'humain et chez la souris. Le groupe de Huang a tout d'abord rapporté le cas d'un enfant mâle ne possédant pas *SRY*, où l'analyse cytogénétique a révélé une duplication du chromosome 17q23-24 contenant la région contenant le gène *SOX9* (Huang *et al.*, 1999). Ces données suggèrent qu'une copie supplémentaire du gène *SOX9* est suffisante pour causer l'inversement de sexe femelle vers mâle en absence du gène *SRY*. Puis, le groupe de Bishop a rapporté la création d'une lignée de souris transgéniques Odsex avec laquelle ils obtiennent des embryons XX mâles en absence du gène *Sry* (Bishop *et al.*, 2000). Ces

souris ont été obtenues accidentellement suite à l'introduction d'un transgène quelconque *Dct-tyrosinase*. Ce transgène s'est inséré à 1Mb en amont du gène *Sox9*, mais l'événement d'insertion a aussi causé une délétion de 150kb dans le promoteur du gène *Sox9*. Le groupe de Bishop a postulé que la délétion avait enlevé un élément répresseur de *Sox9* dans les gonades XX. Ces expériences suggèrent fortement que des hauts niveaux de SOX9 permettent le développement de testicules. Aussi, chez les souris transgéniques, une surexpression de *SOX9* sous le contrôle du promoteur *WT1* cause une inversion de sexe (Vidal *et al.*, 2001).

Chez les embryons de souris, *Sox9* est exprimé non seulement dans les gonades, mais aussi dans les chondrocytes, le cœur, le pancréas et le système central nerveux en développement. Au jour e10,5, au moment où les transcrits de *Sry* commencent à être détectés, *Sox9* est exprimé faiblement dans les gonades en développement chez les deux sexes. Au jour e11,5, *Sox9* est fortement exprimé dans les gonades XY en développement, mais complètement absent dans les gonades XX. Au jour e12,5, il est clair que *Sox9* est exprimé dans les cellules de Sertoli, mais il est absent chez l'ovaire (Morais da Silva *et al.*, 1996). Il a aussi été démontré que la protéine Sox9 est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme avant le jour e11,5 et qu'elle est exclusivement nucléaire au jour e14,5 (Morais da Silva *et al.*, 1996). Contrairement à chez la souris, la protéine SOX9 chez l'humain demeure présente chez les deux sexes quoi qu'en quantité plus élevée au niveau des cellules de Sertoli des testicules en développement. Toujours chez l'humain, à partir du jour E6,5, après le début de l'expression de SRY, la protéine SOX9 qui était cytosolique et nucléaire avant cette période devient exclusivement nucléaire au niveau des cellules de Sertoli alors qu'elle demeure cytosolique dans les cellules folliculaires (De Santa Barbara *et al.*, 2000).

Dernièrement, il a été démontré de façon *in vivo* dans des souris transgéniques que le domaine HMG du gène *Sox9* pouvait substituer le domaine HMG du gène *Sry* et remplacer fonctionnellement *Sry* lors de la détermination du sexe (Bergstrom *et al.*, 2000). Il en était de même pour le domaine HMG du gène *Sox3*. Le gène *SOX3* est le gène *SOX* qui est le plus proche du gène *SRY* en terme de pourcentage d'identité au niveau des nucléotides (67%). La forte similarité de séquence, ainsi que le fait que *Sox3/SOX3* est lié

au chromosome X chez l'humain, la souris et les marsupiaux (Foster *et al.*, 1994 ; Mumm *et al.*, 1997 ; Stevanovic *et al.*, 1993 ; Wright *et al.*, 1993) ont amené l'hypothèse que le gène *SOX3* soit le précurseur évolutif de *SRY*. Le rôle de *Sox3/SOX3* lors de la détermination du sexe, s'il existe, n'est pas encore clair (Stevanovic *et al.*, 1993). Par contre, il est exprimé dans les gonades XX et XY chez la souris lors de la période critique de la détermination du sexe (Collignon *et al.*, 1996). Des souris « knock out » conditionnelles qui cible *Sox3* au niveau des gonades ont démontré que *Sox3* ne semble pas impliqué lors de la détermination du sexe. Par contre, il est important pour le développement normal des ovocytes, la différenciation des testicules et la gamétogénèse (Weiss *et al.*, 2003)

1.4.3 Des protéines qui interagissent avec SRY et SOX9

Il devient de plus en plus évident que la plupart des facteurs de transcription fonctionnent sous forme de complexes. C'est pour cette raison que des recherches ont été menées afin d'identifier des protéines qui interagiraient avec SRY et SOX9. Ces recherches ont révélé certains facteurs qui sont soit communs à SRY et à SOX9 soit spécifiques pour l'un ou l'autre de ces facteurs. Un groupe de ces protéines est impliqué dans le transport nucléaire et l'autre agirait en tant que cofacteurs transcriptionnels.

Aux deux extrémités du domaine HMG de SRY et de SOX9, il y a des signaux consensus de localisation au noyau (NLS) (Preiss *et al.*, 2001 ; Harley *et al.*, en presse). Les protéines qui portent ces signaux sont transportées dans le noyau par des transporteurs cellulaires appelés importines (Jans *et al.*, 2000). Dans les études de transfections de tissus en culture, SRY et SOX9 de type sauvage sont situés au niveau du noyau, alors que SRY et SOX9 des individus qui sont inversés mâle vers femelle et qui contiennent des mutations dans leur deux NLS démontrent une localisation cytoplasmique et nucléaire. Il a été montré que le NLS en C-terminal du domaine HMG de SRY et SOX9 était fortement reconnu par l'importine β (Preiss *et al.*, 2001 ; Harley *et al.*, en presse) et que le NLS en N-terminal de SRY était lié à la calmoduline de façon calcium dépendante (Harley *et al.*, 1996). De plus,

les antagonistes de la calmoduline inhibent l'importation et l'activation transcriptionnelle potentielle de SOX9 (Argentaro *et al.*, 2003). Par ces découvertes, il est possible de croire que les défauts lors de la détermination du sexe chez les individus avec une inversion de sexe pourraient provenir d'une localisation inappropriée de SRY et de SOX9 dans les cellules.

À ce jour, deux cofacteurs transcriptionnels qui interagissent avec SRY humain ont été découverts à partir de criblages deux-hybrides chez la levure. Il s'agit de SIP-1 (SRY interacting protein 1) et de PC4 (Positive coactivator 4) (Poulat *et al.*, 1997 ; Harley *et al.*, en presse). SIP-1 contient deux domaines PDZ (PSD-95, Disc-large and Zo-1) qui permettent des interactions protéine-protéine (Neithammer *et al.*, 1996). Ainsi, SIP-1 pourrait lier les molécules de SRY ensemble ou pourrait recruter d'autres régulateurs transcriptionnels. Comme le domaine d'interaction de SIP-1 n'est pas présent chez SRY de souris, il est possible de croire que cette interaction est spécifique à l'espèce. Dans le cas de PC4, il lierait le domaine HMG de SRY humain. Cette interaction pourrait donc se produire à travers les espèces et pourrait aussi être importante pour l'action d'autres protéines SOX. Parce que PC4 interagit avec les membres de la machinerie transcriptionnelle et une variété d'activateurs transcriptionnels, il a été proposé que cette protéine agit en tant qu'adaptateur capable de lier la machinerie transcriptionnelle et les activateurs (Malik *et al.*, 1998). Ainsi, SRY pourrait lier PC4 et recruter la machinerie d'activation transcriptionnelle.

Finalement, il a été montré que SOX9 pouvait interagir de façon ATP-indépendante avec la protéine HSP70 (heat shock protein 70) (Marshall et Harley, 2001). HSP70 semble être un bon candidat pour la régulation de la fonction de SOX9 lors de l'activation transcriptionnelle. Premièrement, la chaperone HSP70 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle chez d'autres systèmes (Srinivasan *et al.*, 1997 ; Carter *et al.*, 1997) et deuxièmement, elle interagit fortement avec le facteur WT1 (Maheswaran *et al.*, 1998). Or, WT1 est requis pour une pleine activation du gène *MIS* avec SOX9 et SF1 (de Santa Barbara *et al.*, 1998).

1.4.4 Le gène MIS

Un facteur clé dans la différenciation du sexe mâle est l'hormone anti-Müllerienne (AMH) aussi connue sous le nom de substance inhibitrice du canal de Müller (MIS). MIS est un membre de la famille des TGF- β et il est sécrété spécifiquement par les cellules de Sertoli dans les cordons testiculaires embryonnaires (Cate *et al.*, 1986). MIS n'est pas présent dans les gonades femelles. Chez les mammifères mâles, la sécrétion testiculaire de MIS induit la régression du canal de Müller qui se différencie chez la femme en oviducte, en utérus et en partie supérieure du vagin. Les souris déficientes *Amh*^{-/-} sont infertiles car le canal de Müller ne régresse pas et cause des défauts au niveau des canaux. Par contre, le développement des testicules se produit normalement (Behringer *et al.*, 1994 ; Behringer *et al.*, 1995). Ainsi, chez la souris, il semble que MIS n'est pas essentiel à la formation des testicules. La régulation spatiale et temporelle de MIS est importante pour ses actions biologiques (Arango *et al.*, 1999). Au tout début de développement embryonnaire, l'expression de *MIS* est localisée selon un patron sexuellement dimorphique. Chez les souris, *Mis* est exprimé dans les cellules de Sertoli des gonades embryonnaires mâles à partir du jour e13,0 jusqu'à la naissance (Munsterberg et Lovell-Badge, 1991).

1.4.5 Le gène *SF1*

Le gène *SF1* (Steroidogenic factor 1) code pour un facteur de transcription membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins hormonaux. C'est une famille de récepteurs qui ne possèdent pas de ligand défini. Ils peuvent participer à l'activation transcriptionnelle à l'aide de différents ligands comme les hormones stéroïdiennes, l'hormone thyroïdienne, la vitamine D, les rétinoïdes et les acides biliaires. Ce facteur de transcription possède un domaine de liaison à l'ADN composé de deux doigts de zinc qui sont hautement conservés entre les espèces de mammifères. Aussi, le domaine à l'extrémité carboxyl de la région du doigt de zinc est très conservé (Parker, 1998). Le facteur SF1 a été premièrement identifié comme étant un important régulateur des hydroxylases stéroïdiennes du cytochrome P450 dans le cortex surrénal et les gonades (Lala *et al.*, 1992 ;

Honda *et al.*, 1993). En plus des hydrolases stéroïdiennes, SF1 semble jouer un rôle encore plus général au niveau de la stéroïdogénèse des surrénales et des gonades et au niveau de la reproduction. En effet, il influence l'expression de plusieurs gènes codant pour des facteurs impliqués dans ces processus tels que la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase, les récepteurs de la prolactine, de la corticotropine, de la LH (luteinizing hormone), et de la FSH (follicle-stimulating hormone), la substance inhibitrice du canal de Müller (MIS), l'Insl3 et l'inhibine (Parker, 2002). Les souris allèle-nulle pour le gène *Sf1* ne possèdent pas de glandes surrénales, ni de gonades. Les gonades des embryons de ces souris cessent de se développer entre les jours e11-11,5 et dégèrent via un processus d'apoptose (Luo *et al.*, 1994). La déficience en testostérone et en Mis qui découle de l'absence de testicules cause chez les souris allèle-nulle XY une inversion de sexe mâle vers femelle au niveau des appareils génitaux interne et externe. Récemment, un cas de d'inversion complète de sexe chez l'humain dû à une mutation dans le gène *SF1* a été répertorié (Achermann *et al.*, 1999). Ce patient possède un allèle normal du gène *SF1* et un allèle qui contient deux mutations non-sens *de novo* qui abolissent la liaison de SF1 à l'ADN. Chez cet individu, les gonades sont présentes contrairement aux souris allèle-nulle, mais elles sont malformées.

Sf1 est exprimé dans les cellules somatiques des crêtes génitales XX et XY au moment où les gonades bipotentielles commencent à se former, c'est-à-dire au jour e10,0 chez la souris (Ikeda *et al.*, 1994). Dans les gonades mâles, l'expression continue dans les cellules précurseurs des cellules de Leydig et de Sertoli jusqu'au jour e12,5 pour finalement se restreindre aux cellules de Leydig où il va contrôler la production d'hormones stéroïdiennes. Dans les gonades femelles, l'expression de *Sf1* est observée dans les cellules somatiques jusqu'au jour e13,0 (Ikeda *et al.*, 1996).

1.4.6 Le gène *WT1*

Le gène *WT1* (Wilm's tumor gene 1) fut isolé chez l'humain par clonage positionnel en relation avec le locus de la tumeur de Wilm qui est un cancer du rein (Call *et al.*, 1990). Son homologue chez la souris fut cloné par criblage d'une librairie d'ADNc de rein fœtal

avec une sonde produite à partir des séquences humaines (Buckler *et al.*, 1991). Des études d'expression ont démontré la présence de transcrits au niveau de tout le système urogénital (Pelletier *et al.*, 1991c). *Wt1* est exprimé dans les cellules somatiques des gonades bipotentielles en développement au jour e10,0 (Racley *et al.*, 1993).

Le gène *WT1* code pour un facteur de transcription à doigts de zinc fortement conservé entre la souris et l'humain (95%). Le gène *WT1* produit plus de 24 isoformes différents de la protéine soit par épissage alternatif (Reddy et Licht, 1996), soit par des sites de début de traduction alternatif ou par «RNA editing » (Sharma *et al.*, 1994). Ces isoformes réguleraient la transcription en interagissant avec des sites spécifiques de reconnaissance à l'ADN en amont des gènes cibles. En plus de différer au niveau de leur préférence pour la liaison à l'ADN, les isoformes de *WT1* qui contiennent (+KTS) ou qui ne contiennent pas (-KTS) les acides aminés Lys-Thr-Ser entre le troisième et le quatrième doigts de zinc se localisent de façon différente dans le noyau. Ainsi, les isoformes -KTS montre un patron de coloration plus diffus au niveau du noyau alors que les isoformes +KTS semblent associés avec les complexes d'épissages. Ainsi, de plus en plus d'évidences indiquent que les isoformes -KTS et +KTS auraient des fonctions distinctes dans le noyau. Les isoformes -KTS seraient plus actifs lors de la régulation transcriptionnelle, alors que les isoformes +KTS auraient un rôle à jouer lors de l'épissage alternatif et lors de la régulation de l'ARN (Larsson *et al.*, 1995 ; Ladomery *et al.*, 1999 ; Englert *et al.*, 1995).

La première évidence que *WT1* pourrait jouer un rôle lors du développement des gonades provient du fait que des mutations ponctuelles au niveau du gène *WT1* entraînent des malformations urogénitales (Baird *et al.*, 1992 ; Pelletier *et al.*, 1991a ,1991b). Un rôle définitif pour le facteur WT1 dans le développement des gonades fut clairement établi avec la création de souris déficientes en *Wt1* (Kreidberg *et al.*, 1993). Les souris homozygotes mouraient *in utero* sans reins et sans gonades et elles présentaient un phénotype femelle. Cela impliquait donc que *Wt1* avait un rôle majeur à jouer lors de la formation des gonades bipotentielles. Tout récemment, des souris allèle-nulle pour deux isoformes de *Wt1* (-KTS et + KTS) ont été produites (Hammes *et al.*, 2001). Seule la souris allèle-nulle pour

l'isoforme +KTS de *Wt1* a démontré une inversion de sexe complète mâle vers femelle causée par une réduction dramatique des niveaux d'expression de *Sry*. L'allèle +KTS de *Wt1* semble donc être impliqué lors de la détermination du sexe, mais pas l'allèle -KTS.

1.4.7 Le gène *GATA4*

Le gène *GATA4* code pour une protéine de la famille des facteurs de transcription GATA qui sont des protéines à doigts de zinc. Cette famille comprend les facteurs GATA1 à GATA6. Les protéines GATA tiennent leur nom de leur site de reconnaissance sur l'ADN (T/A)GATA(A/G). Elles jouent des rôles critiques dans plusieurs processus développementaux tels que la différenciation des cellules hématopoïétiques et des cellules T, le développement de la vascularisation cardiaque et coronarienne et la morphogénèse du foie, des poumons et de l'estomac (Patient et McGhee, 2002 ; Orkin, 2000 ; Molkentin, 2000 ; Ho *et al.*, 2002 ; Van Esch *et al.*, 2000 ; Rossi *et al.*, 2001 ; Jacobsen *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2002). Des souris déficientes en *Gata4* ont permis de démontrer son rôle essentiel dans le développement du cœur et de la morphogénèse du ventre (Kuo *et al.*, 1997 ; Molkentin *et al.*, 1997). Un rôle dans la détermination/différenciation du sexe pour *GATA4* ne fut proposé que récemment (Viger *et al.*, 1998 ; Tremblay et Viger, 1999).

Gata4 est exprimé au niveau des cellules somatiques des crêtes génitales à partir du jour e11,5 chez les deux sexes. Au jour e13,5, l'expression de *Gata4* devient sexuellement dimorphique. L'expression dans les gonades mâles est augmentée dans les cellules de Sertoli, mais elle est diminuée dans les cellules intersitiales, alors que dans les gonades femelles, l'expression est diminuée dans toutes les cellules (Viger *et al.*, 1998). De plus, des études de co-transfections ont permis d'établir un rôle pour GATA4 dans la transactivation du gène *MIS* (Viger *et al.*, 1998 ; Tremblay et Viger, 1999). Il fut aussi démontré par mutagénèse que les sites de liaisons pour GATA4 dans le promoteur du gène *MIS* était requis pour l'expression de *MIS* au niveau des cellules de Sertoli de rats nouveaux-nés (Watanabe *et al.*, 2000). Puisque les souris déficientes en *Gata4* meurent entre les jours e7-e9,5 suite à des problèmes de cœur, l'analyse de la différenciation des

gonades en absence de *Gata4* est malheureusement impossible chez ces souris. Des mutations conditionnelles du gène *GATA4* seront nécessaires pour déterminer le rôle de ce facteur lors du développement des gonades *in vivo*.

Finalement, il a été démontré que GATA4 et le facteur FOG2 étaient nécessaires à la différenciation des gonades (Tevosian *et al.*, 2002). FOG2 fait partie d'un groupe de co-facteurs appelés FOG (Friends of GATA). La fonction normale *in vivo* des facteurs GATA chez les vertébrés et *Drosophila* requiert des interactions physiques avec les protéines à doigts de zinc de la famille FOG (Cantor et Orkin, 2002). Des embryons de souris homozygotes pour une déficience en *Fog2* ou homozygotes pour une mutation dirigée dans *Gata4* qui empêche l'interaction de Gata4 avec les facteurs Fog démontrent des anomalies lors de la gonadogénèse (Tevosian *et al.*, 2002).

1.4.8 Le gène *DMRT1*

En général, la structure des gènes clés de la détermination et de la différenciation du sexe est très peu conservé entre les animaux. À ce jour, les seules exceptions à cette règle sont des gènes à domaine DM qui auraient potentiellement un ancêtre commun impliqué dans le développement sexuel chez plusieurs espèces de vertébrés et d'invertébrés. Ce sont les gènes *dsx* (*Drosophila* doublesex) (Baker *et al.*, 1980), *mab3* de *C.elegans* (Shen *et al.*, 1988) et *DMRT1* chez l'humain et la souris (Raymond *et al.*, 1998). Récemment, un autre gène à domaine DM a été identifié chez le corail *Acropora millepora* et l'expression de ce gène est corrélée avec la reproduction sexuelle (Miller *et al.*, 2003).

Le gène *DMRT1* (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) est le premier gène possédant un domaine DM isolé chez l'humain et chez la souris (Raymond *et al.*, 1998, 1999b). Il a été identifié par homologie avec des gènes impliqués dans la détermination du sexe chez *Drosophila Melanogaster* (doublesex ou *dsx*) et chez *C.elegans* (*mab-3*) par des chercheurs intéressés au développement sexuel de *C.elegans* (Raymond *et al.*, 1998). Ces deux gènes possèdent un domaine DM semblable qui est un motif de liaison

à l'ADN à doigt de zinc (Erdman *et al.*, 1993 ; Raymond *et al.*, 1998). Chez l'humain, le gène *DMRT1* est localisé au niveau du locus autosomal 9p24.3 (Flejter *et al.*, 1998 ; Guioli *et al.*, 1998). Lorsque ce locus est hémizygote, il est associé à un défaut au niveau du développement testiculaire et à une féminisation XY (Bennet *et al.*, 1993 ; Crocker *et al.*, 1998 ; Veitia *et al.*, 1998). Il faut noter cependant que cette région critique du chromosome 9p dans les cas d'inversion du sexe contient non seulement le gène *DMRT1*, mais aussi deux autres gènes à domaine DM appelé *DMRT2* (Raymond *et al.*, 1999a) et *DMRT3* (Kim *et al.*, 2003). Il est donc possible que l'inversion du sexe chez les patients XY soit due à la perte d'un allèle *DMRT1* et/ou d'un allèle de *DMRT2* et *DMRT3*. Chez la souris, la délétion de l'allèle du gène *Dmrt1* murin démontre que *DMRT1* n'est pas nécessaire pour la détermination du sexe, mais qu'il est plutôt essentiel pour la différenciation postnatale des testicules, notamment au niveau de la spermatogénèse. Ces problèmes morphologiques observés chez les souris *Dmrt1*^{-/-} sont similaires à ceux observés chez les humains qui sont hémizygotes pour le locus 9p24.3. De plus, il semble que le gène *DMRT1* n'est pas nécessaire au développement ovarien, car les souris femelles sont complètement fertiles (Raymond *et al.*, 2000).

Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé dans les crêtes génitales chez les deux sexes à des niveaux similaires entre les jours e10,5-e13,5 du développement des gonades. Entre les jours e14,5-e15,5, l'expression de *Dmrt1* chute dans les ovaires, mais elle est augmentée dans les testicules. L'expression se situe au niveau des cellules de Sertoli et des cellules germinales (Raymond *et al.*, 1999a).

Quant au mode d'action potentiel de la protéine DMRT1, il ne peut être extrapolé pour le moment qu'à partir des membres de sa famille chez les invertébrés soit *Dsx* (doublesex) et *Mab-3*. Toutes ces protéines sont apparentées par un domaine DM qui permet la liaison à l'ADN dans le cas de *Dsx* et *Mab-3* (Erdman et Burtis, 1993 ; Raymond *et al.*, 1998). Il est donc possible de croire que DMRT1 pourrait aussi se lier à l'ADN par son domaine DM, et ainsi moduler la transcription d'autres gènes de façon positive ou négative, même si aucun site de reconnaissance n'a encore été identifié jusqu'à maintenant chez l'humain et la souris

Tout récemment, trois autres gènes à domaine DM chez la souris ont été identifiés comme étant de nouveaux joueurs intéressants lors du développement sexuel mâle ou femelle. Tout comme *Dmrt1*, ils sont exprimés dans les gonades embryonnaires : il s'agit de *Dmrt3*, *Dmrt4* et *Dmrt7* (Kim *et al.*, 2003). Au jour e11,5, *Dmrt4* est exprimé à des niveaux similaires dans les gonades XX et XY, alors que *Dmrt3* et *Dmrt7* démontrent un certain patron d'expression sexe-spécifique. *Dmrt3* est initialement exprimé à des niveaux similaires dans les crêtes génitales mâles et femelles, mais l'expression dans les ovaires décline après le jour e13,5, alors qu'elle est maintenue dans les testicules. Dans le cas de *Dmrt7*, il est exprimé à de plus hauts niveaux dans les gonades XX que XY à partir du jour e11,5, juste avant la différenciation sexuelle et continue jusqu'au jour e15,5. Ainsi, plusieurs aspects de la différenciation sexuelle pourraient être contrôlés par différents membres de la famille des gènes à domaine DM.

1.4.9 Les gènes *LHX1* (*LIM1*) et *LHX9*

Les facteurs de transcription LHX (LIM homeobox domain) font partie de la grande famille de facteurs de transcription appelés protéines à domaine homéo LIM (LIM-homeodomain proteins ou LIM-HD proteins) dont des membres sont retrouvés à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Hobert et Westphal, 2000). Les membres de cette famille comme les autres gènes à boîte homéo sont d'importants régulateurs du développement (Hobert et Westphal, 2000).

Le gène *LHX1* semble impliqué dans les premières étapes du développement des gonades indifférenciées. Chez les souris mutantes *Lhx1*^{-/-}, le développement des gonades est arrêté juste avant la différenciation sexuelle et les souris meurent *in utero* ou peu de temps après la naissance, probablement en raison de problèmes de développement des reins et du cerveau (Shawlot *et al.*, 1995). En fait, les reins, le cerveau et les gonades sont complètement absents chez ces souris. À ce jour, aucune analyse d'expression du gène *Lhx1* au niveau des gonades n'a été rapportée. Par contre, il a été mentionné qu'il y avait de

l'expression au niveau du mésoderme intermédiaire entre le jour e7,5 et e10,5 (Barnes *et al.*, 1994).

Quant au gène *Lhx9*, il est exprimé dans la région des futures crêtes génitales au jour e9,5 chez les souris mâles et femelles (Birk *et al.*, 2000). Des souris qui sont mutantes pour la fonction de *Lhx9* et qui sont génétiquement mâles sont phénotypiquement femelles et n'ont pas de gonades. De plus, dû à l'absence de gonades chez les deux sexes, les souris *Lhx9*^{-/-} sont infertiles, elles possèdent un utérus, un vagin et des oviductes atrophiés, elles n'ont aucun organe sexuel accessoire ou cycle oestral et elles ont des niveaux élevés de FSH avec des niveaux non détectables de testostérone. Chez les souris normales, *Lhx9* est aussi exprimé au niveau du système nerveux central, des pattes et du pancréas (Bertuzzi *et al.*, 1999 ; Retaux *et al.*, 1999). Par contre, l'analyse des embryons déficients en *Lhx9* démontre que seul le développement des gonades est affecté (absence de gonades) (Birk *et al.*, 2000). Cela pourrait s'expliquer par une certaine redondance de sa fonction avec d'autres gènes *Lhx* au niveau du système nerveux central, des pattes et du pancréas.

1.4.10 Le gène *DAX1*

DAX1 (DSS-AHC critical region on the X) est un membre atypique de la superfamille des récepteurs nucléiques hormonaux (Zanaria *et al.*, 1994). Il possède le domaine de liaison au ligand, mais ne possède pas le motif de liaison à l'ADN en doigt de zinc typique au récepteur hormonal nucléaire. Cela suggère que le facteur *DAX1* contrôle l'expression des gènes par des interactions protéine-protéine. À ce jour, aucun ligand pour *DAX1* n'a été découvert, ce qui en fait un récepteur nucléaire orphelin.

Le gène *DAX1* a été isolé pour la première fois chez l'humain par clonage positionnel dans une région du chromosome Xp où se chevauchent deux locus reliés à des pathologies différentes soit AHC (Adrenal Hypoplasia Congenita) et DSS (Dosage Sensitive Sex reversal) (Zanaria *et al.*, 1994). Des mutations dans le gène *DAX1* entraînent la maladie AHC. En plus de souffrir d'une hypoplasie adrénérergique, les individus mâles souffrant de

AHC manifestent de l'hypogonadisme hypogonadotrophique dû à des défauts combinés au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Le phénotype des individus atteints de AHC ressemble beaucoup au phénotype des souris déficientes en *Sf1*, ce qui suggère que *DAX1* et *SF1* puissent agir sur la même voie développementale. La duplication de la région Xp21.3 où est localisé le gène *DAX1* cause la maladie DSS. Cette duplication entraîne le développement femelle en présence d'une copie fonctionnelle de *SRY* sur le chromosome Y (Ogata *et al.*, 1992 ; Bardoni *et al.*, 1994). Chez la souris, une surexpression du gène *Dax1* a permis d'inverser le sexe d'une souris XY, mais dans une lignée avec un allèle faible de *Sry* (Swain *et al.*, 1998). Ces derniers faits suggèrent que *DAX1* puisse inhiber la voie développementale mâle. Par contre, les expériences de « knock out » chez les souris transgéniques ont exclu la possibilité que le gène *DAX1* soit le facteur qui détermine les ovaires. Les souris femelles déficientes en *Dax1* démontrent un développement ovarien complètement normal alors que les mâles sont infertiles (Yu *et al.*, 1998a). Il semble même que *Dax1* ait un rôle à jouer dans la spermatogénèse chez les souris mâles puisque celles-ci sont stériles. Récemment, il a été montré que *DAX1* était en fait requis pour la détermination des testicules (Meeks *et al.*, 2003).

DAX1 est exprimé dans plusieurs tissus endocrins, incluant les gonades. Dans les testicules, il est localisé dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig et dans les ovaires, il est exprimé dans les cellules de granulosa et les cellules de la thèque. Pour ce qui est de l'expression de *Dax1* chez la souris, elle commence faiblement chez les deux sexes au jour e10,5, elle augmente ensuite au jour e11,5 et, à partir du jour e12,5, elle chute au niveau des testicules alors qu'elle se maintient au niveau des ovaires (Swain *et al.*, 1996). L'expression de *DAX1* est plutôt controversée, car une étude d'expression chez le rat (qui a une période de gestation semblable à celle de la souris) a démontré que les niveaux de *Dax1* étaient semblables au niveau des testicules et des ovaires aux jours e13,5 et e15,5 et qu'ils étaient plus élevés au niveau des testicules que dans les ovaires au jour e18,5 (Nachtigal *et al.*, 1998). Chez l'humain, *DAX1* est exprimé faiblement environ 10 jours avant *SRY* chez les deux sexes et ce faible niveau d'expression demeure le même au niveau des testicules et des ovaires en développement au moins jusqu'aux 18ème et 15ème semaines de gestation (Hanley *et al.*, 2000).

1.4.11 Le gène *WNT4*

Avec l'analyse des souris *Wnt-4*^{-/-}, un premier facteur essentiel à la différenciation sexuelle des ovaires a pu être identifié (Vainio *et al.*, 1999). Le gène *WNT4* code pour un membre d'une famille de glycoprotéines sécrétées, les WNT. Ces protéines sont des molécules de signalisation qui jouent des rôles clés dans la régulation de gènes (Dale, 1998). Chez les mammifères, la signalisation par les WNTs est impliquée dans une grande variété de processus développementaux, incluant la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que des interactions épithélium-mésenchyme (Smalley et Dale, 1999). Pour contrôler l'expression des gènes, les ligands WNT peuvent interagir avec les récepteurs de la famille « Frizzled » et le signal se poursuit via la β -caténine et le facteur de complexe tertiaire (TCF). Les études d'expression chez la souris ont démontré que le gène de la molécule de signalisation *Wnt-4* commençait à être exprimé au niveau de l'épithélium coelomique des deux sexes au jour e9,5, mais à partir du jour e11,5, cette expression devient dimorphique en faveur des ovaires puisque l'expression diminue au niveau des testicules. Chez les souris femelles qui n'ont pas le gène *Wnt4*, on observe la présence d'organes génitaux internes et externes masculinisés (pas de canal de Muller et les structures de Wolff se développent normalement) alors que les souris mâles semblent normales. De plus, les femelles expriment la stéroïde 17 α -hydroxylase dans leurs ovaires. Tout cela suggère que *WNT4* a un rôle essentiel dans le développement du système reproducteur femelle et dans la suppression de la voie de développement mâle (Vainio *et al.*, 1999). Chez l'humain, en concordance avec ce modèle, la duplication de la région du chromosome 1p31-p35 qui inclut *WNT4* est associée à l'inversion de sexe mâle vers femelle chez les individus 46, XY (Jordan *et al.*, 2001).

1.5 RÔLE ET INTÉGRATION DES GÈNES DANS LE MÉCANISME DE LA DÉTERMINATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.

1.5.1 Au niveau de la formation des gonades bipotentielles

Les gènes *SF1*, *WT1* et *LHX9* jouent un rôle majeur dans la formation des gonades bipotentielles. Les souris knock-out pour ces gènes ne développent pas de gonades quelque soit le sexe. Les souris *Sf1*^{-/-} sont capables d'initier le développement des gonades, mais à partir du jour e12,5, les gonades XX et XY dégénèrent par apoptose (Luo *et al.*, 1994). Chez les souris *Wt1*^{-/-}, les reins et les gonades ne sont tout simplement pas formés (Kriedberg *et al.*, 1993) et les souris déficientes en *Lhx9* n'ont pas de gonades (Birk *et al.*, 2000). *SF1* qui code pour un membre de la famille des récepteurs nucléaires hormonaux orphelin est exprimé dans les cellules somatiques des crêtes génitales XX et XY au moment où les gonades bipotentielles commencent à se former, c'est-à-dire au jour e10,0 chez la souris (Ikeda *et al.*, 1994). Dans les gonades mâles, l'expression continue dans les cellules précurseurs des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli jusqu'au jour e12,5 pour finalement se restreindre aux cellules de Leydig où *Sf1* va contrôler la production d'hormones stéroïdiennes. Dans les gonades femelles, l'expression de *Sf1* est observée dans les cellules somatiques jusqu'au jour e13,0 (Ikeda *et al.*, 1996). Le gène *WT1* qui code pour un facteur de transcription possédant un domaine de liaison en doigt de zinc est aussi exprimé dans les cellules somatiques des gonades bipotentielles en développement au jour e10,0 (Racley *et al.*, 1993). À ce jour, bien qu'il existe très peu d'études d'expression de gènes réalisées chez l'humain (Hanley *et al.*, 1999 ; De Santa Barbara *et al.*, 2000), les résultats obtenus pour *WT1* et *SF1* correspondent à ceux obtenus chez la souris. En effet, ces deux gènes sont exprimés avant la période d'expression du gène *SRY* qui débute à la sixième semaine du développement embryonnaire (semaine E6) et ils sont maintenue jusqu'au moins la semaine E8 au niveau des testicules alors que les ovaires n'ont pas été testés dans ces études.

En plus des gènes *WT1* et *SF1*, *LHX9* est un facteur de transcription à homéodomaine qui semble aussi être impliqué dans le début de la formation des gonades chez les deux sexes. Des observations chez le rat ont montré que l'expression de *Lhx9* était présente dans les gonades indifférenciées, mais qu'elle disparaissait lorsque les cellules épithéliales se différenciaient en cellules de Sertoli et qu'elles commençaient à exprimer

l'hormone MIS (Mazaud *et al.*, 2002). Des études suggèrent que LHX9 agirait en amont de SF1, car l'expression de SF1 est dramatiquement réduite chez les souris *Lhx9*^{-/-} (Birk *et al.*, 2000).

Les cibles de l'action de ces trois gènes sont néanmoins majoritairement inconnues durant cette période du développement des gonades. Toutefois, des études récentes *in vitro* ont permis d'observer que WT1 était capable de transactiver le promoteur *SRY* humain (Hossain et Saunders, 2001) et qu'uniquement sa forme -KTS pouvait lier et transactiver le promoteur de *Sf1* murin (Wilhelm *et al.*, 2002). Dans le cas de SF1, il était capable de transactiver les promoteurs humain et porcin de *SRY* (de Santa Barbara *et al.*, 2001 ; Pilon *et al.*, 2003). Pour ce qui est de LHX9, des études ont démontré que LHX9 activait directement le gène *SF1* tout comme *WT1* (Wilhelm *et al.*, 2002).

1.5.2 Au niveau de la détermination du sexe

Suite à la formation des gonades bipotentiellles, il y a au moins cinq gènes qui semblent être exprimés de façon précoce pour induire ou participer directement à la détermination des sexes. Ce sont les gènes *SRY*, *SOX9*, *DAX1*, *GATA4* et *FGF9*. Des patients qui souffrent d'inversion de sexe montrent des mutations dans trois de ces gènes : *SRY*, *SOX9* et *DAX1* (Gubbay *et al.*, 1990 ; Wagner *et al.*, 1994 ; Zanaria *et al.*, 1994). À ce jour, aucune maladie chez l'humain causant une inversion de sexe n'a été associée à une mutation dans le gène *FGF9* et *GATA4*. Par contre, chez la souris *Fgf9*^{-/-}, la plupart des souris génétiquement mâles démontrent un phénotype femelle (Colvin *et al.*, 2001). Chez la souris, les cinq gènes possèdent un patron d'expression dimorphique au niveau des gonades embryonnaires et ils ont un profil temporel très similaire.

1.5.3 La régulation de l'expression du gène *SRY*

Le gène *SRY* est le gène clé qui déclenche la cascade de la détermination du sexe chez les mammifères mâles. Il est le seul gène sur le chromosome Y nécessaire et capable de déclencher le développement des testicules (Koopman *et al.*, 1991). Lorsque le gène *SRY* n'est pas présent, les gonades se différencient en ovaires par défaut. Depuis son clonage en 1990, beaucoup de choses demeurent inconnues concernant sa propre régulation et les gènes ciblés par son action.

Le gène *SRY* humain présente plusieurs sites différents de début de la transcription (Behlke *et al.*, 1993 ; Clépet *et al.*, 1993 ; Vilain *et al.*, 1992 ; Su *et al.*, 1993). La séquence 5' flanquante du gène *SRY* abrite entre autres deux sites de liaison pour le facteur SP1 et des sites de liaisons potentiels pour les protéines SOX et WT1. Il a été montré que les éléments de régulation requis pour l'activité basale du promoteur humain se situaient à l'intérieur des 310 premières paires de bases en amont du site du début de la traduction (Su *et al.*, 1993). Les deux sites de liaison SP1 qui se situent à l'intérieur de ces 310 pb ont été caractérisés au niveau de leur fonction (Desclozeaux *et al.*, 1998), mais il semble qu'ils ne soient pas responsables de l'expression tissu-spécifique de *SRY*. Par ailleurs, il a été montré que les facteurs WT1 (+KTS) et SF1 pouvaient lier et transactiver le promoteur *SRY* humain (Shimamura *et al.*, 1997 ; Hossain *et al.*, 2001 ; De Santa Barbara *et al.*, 2001). Récemment, une autre étude *in vitro* a démontré que le facteur SF1 pouvait lier et transactiver le promoteur *SRY* porcin (Pilon *et al.*, 2003). Ceci suggère que les facteurs WT1 et SF1 pourraient contribuer au patron d'expression tissu-spécifique de *SRY*. Aussi, plusieurs sites potentiels de régulation fortement conservés ont été identifiés en analysant différents gènes *SRY* entre les espèces (Margarit *et al.*, 1998). On retrouve entre autres des sites de liaison potentiels pour la protéine *SRY* elle-même. Finalement, il a été montré que SOX9 pouvait transactiver le promoteur *SRY* porcin via un site de liaison à -205pb à partir du site d'initiation de la traduction (Daneau *et al.*, 2002).

Contrairement aux séquences promotrices humaine et porcine, la séquence promotrice du gène *Sry* murin est très peu caractérisée, probablement à cause de la complexité de son organisation génomique. Une étude a permis l'identification d'une région de promoteur contrôlant la transcription de transcrits circulaires de *Sry* au niveau des

cellules germinales de mâles adultes et au niveau des gonades embryonnaires après la période d'expression du transcrit linéaire (Dolci *et al.*, 1997). Ce transcrit circulaire n'est donc probablement pas impliqué dans le processus de détermination du sexe.

1.5.4 Les conséquences de l'expression de *SRY*

À ce jour, aucun gène cible de l'action de *SRY* n'a pu être identifié. Cependant, il semble que la présence de *SRY* soit importante pour certains processus cellulaires uniques au développement des testicules. Le facteur *SRY* est responsable, directement ou indirectement, de la différenciation des cellules de support précurseurs en cellules de Sertoli (Burgoyne *et al.*, 1988), de la migration des cellules mésenchymateuses à partir du mésonéphros vers les gonades (Buehr *et al.*, 1993 ; Merchant-Larios *et al.*, 1993 ; Martineau *et al.*, 1997 ; Capel *et al.*, 1999), de la formation des cordons testiculaires (Tilman et Capel, 1999) et de l'induction de la prolifération cellulaire et de la vascularisation dans les gonades XY (Schmalh *et al.*, 2000). Récemment, des cultures d'organes ont montré que la migration des cellules provenant du mésonéphros pouvait être renversée dans les gonades XX suite à l'application ectopique du facteur FGF9, une molécule de signalisation intercellulaire (Colvin *et al.*, 2001). *SRY* pourrait donc agir directement sur les changements cellulaires dans les gonades en développement à travers l'activation de FGF9. Une déficience en *Fgf9* chez les souris cause une inversion de sexe mâle vers femelle (Capel *et al.*, 2001).

1.5.5 La relation entre *SRY* et *SOX9*

La petite fenêtre de temps d'expression du gène *SRY* dans les crêtes génitales suggère que la protéine encodée par ce gène agirait seulement comme un facteur d'initiation de la différenciation des cellules de Sertoli. Cette expression transitoire fait aussi en sorte que le gène *SRY* ne peut être responsable du maintien de l'identité et de la fonction des cellules de Sertoli. Il faut donc que *SRY* puisse permettre l'activation ou la

répression d'autres gènes en aval qui s'occuperaient de la définition et du maintien de l'identité des cellules de Sertoli. À ce jour, le meilleur candidat à ce titre est le gène *SOX9*.

Le gène *SOX9* code pour une protéine à boîte HMG comme *SRY*, mais qui possède en plus, contrairement à *SRY*, un très bon domaine de transactivation (Sudbeck *et al.*, 1996). De plus, la protéine entière est fortement conservée à travers l'évolution des vertébrés contrairement à *SRY* qui n'est présent que chez les mammifères. Le patron d'expression de ces deux gènes au niveau des gonades embryonnaires chez la souris et l'humain est en parfait accord avec cette hypothèse (Morais da Silva *et al.*, 1996 ; Kent *et al.*, 1996 ; de Santa Barbara *et al.*, 2000). En effet, chez la souris, l'expression du gène *Sox9* augmente spécifiquement au niveau des testicules, tout juste après la période d'expression du gène *Sry* au jour e12,5. Il est aussi clair, à partir de ce moment, que l'expression du gène *Sox9* se situe au niveau des cellules de Sertoli et ce pour la vie entière du mâle alors qu'il n'y en a pas au niveau des ovaires. Quant aux résultats chez l'humain, ils démontrent un déplacement de la protéine *SOX9* du cytoplasme vers le noyau des cellules de Sertoli, suite à l'expression de *SRY*, ce qui n'est pas observé au niveau des cellules folliculaires (de Santa Barbara *et al.*, 2000). Finalement, notre groupe a comme hypothèse que la protéine *SOX9* contribue à une rétro-activation du gène *SRY* chez le porc et par analogie chez l'humain, mais pas chez la souris Daneau *et al.*, 2002).

Il est cependant accepté, selon différents cas d'inversion de sexe mâle vers femelle et vice versa impliquant *SOX9* chez l'humain et chez la souris, que ce gène a un rôle majeur dans la détermination des cellules de Sertoli (Foster *et al.*, 1994 ; Wagner *et al.*, 1994 ; Huang *et al.*, 1999 ; Bishop *et al.*, 2000). De plus, contrairement à *SRY*, un gène cible de l'action de *SOX9* au niveau des cellules de Sertoli des testicules en développement a été clairement identifié. Effectivement, *SOX9* est nécessaire à l'activation du gène qui code pour l'hormone MIS (de Santa Barbara *et al.*, 1998 ; Arango *et al.*, 1999).

1.5.6 La régulation de l'expression du gène *MIS*

Présentement, il y a au moins cinq facteurs qui semblent contribuer à la production de l'hormone MIS par les cellules de Sertoli pendant le développement embryonnaire. Parmi les candidats, on retrouve les facteurs SF1, WT1, SOX9, SOX8 et GATA4. Au niveau du promoteur *MIS* chez la souris et chez l'humain, on retrouve des séquences conservées qui correspondent à des sites de liaison importants pour le facteur SF1 (CCAAGGTCA) et pour le facteur SOX9 (CCTTGAG) (Shen *et al.*, 1994 ; Giuli *et al.*, 1997 ; Bell *et al.*, 1997). Il a été démontré *in vitro* que la transactivation exercée par SF1 sur le promoteur *Mis* de souris pouvait être synergisée par un autre facteur impliqué dans la formation des gonades bipotentielles soit WT1 (Nachtigal *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que cette synergie pouvait être inhibée par le facteur DAX1. Par contre, WT1 ne semble pas lier directement l'ADN et transactiver le promoteur *MIS* par lui-même. En parallèle, le groupe de de Santa Barbara a démontré que le site de liaison pour les protéines SOX qui existe sur le promoteur *MIS* pouvait être lié par SOX9 et que cette liaison était suffisante pour transactiver le promoteur *MIS* (de Santa Barbara *et al.*, 1998). À partir des études de mutagenèse *in vivo*, des mutations au niveau du site de liaison endogène de Sox9 sur le promoteur *Mis* abolit l'expression de *Mis* chez la souris (Arango *et al.*, 1999). Il fut aussi démontré que SOX9 pouvait interagir directement avec SF1 et permettre ainsi une activation synergisée du promoteur *MIS*.

Le gène *SOX8* est un membre de la famille Sox qui est fortement relié au gène *SOX9*. Tout comme *Sox9*, *Sox8* est exprimé dans les testicules de souris en développement au moment de la détermination du sexe. Il a été montré depuis peu de temps que SOX8 était probablement impliqué lui aussi dans la régulation de l'expression de *MIS*. En effet, l'expression de *Sox9* débute juste avant l'expression du gène *Mis* au jour e12 dans les testicules de souris et elle est toujours présente au jour e16 dans les cellules de Sertoli (Schepers *et al.*, 2003). Des études *in vitro* ont montré que SOX8 se liait spécifiquement aux sites de liaisons SOX à l'intérieur du promoteur minimal de *MIS* et que tout comme SOX9, il activait l'expression de *MIS* en synergie avec SF1 par des interactions protéine-protéine (Schepers *et al.*, 2003).

Le facteur GATA4 semble aussi jouer un rôle dans la régulation de la transcription du gène *MIS* (Viger *et al.*, 1998). Des études subséquentes démontrent qu'en plus de pouvoir transactiver le promoteur *MIS* par lui-même, ce facteur peut lui aussi agir en synergie avec SF1 (Tremblay et Viger, 1999). Tout comme dans le cas de la synergie WT1/SOX9, la synergie SF1/GATA4 peut être inhibée par DAX1. Cette inhibition se ferait via une interaction directe avec SF1 plutôt qu'avec GATA4 (Tremblay *et al.*, 2001).

1.5.7 Le contrôle de l'activité de *GATA4*

En plus d'un potentiel contrôle exercé par une interaction entre GATA4 avec le facteur SF1, l'activité de GATA4 pourrait aussi être contrôlée transcriptionnellement via un groupe de co-facteurs appelés FOG (Friends of GATA). En fait, la fonction normale *in vivo* des facteurs GATA chez les vertébrés et *D.melanogaster* requiert des interactions physiques avec les protéines à doigt de zinc de la famille FOG (Cantor et Orkin, 2001). À ce jour, il a été montré que l'activation de la transcription par GATA4 était inhibée spécialement par FOG2 et que Fog2 était co-exprimé avec Gata4 durant le développement des gonades chez la souris (Lu *et al.*, 1999 ; Svensson *et al.*, 1999 ; Tevosian *et al.*, 1999). Finalement, il a été démontré que GATA4 et le facteur FOG2 étaient nécessaires à la différenciation des gonades. Des embryons de souris homozygotes pour une déficience en *Fog2* ou homozygotes pour une mutation dirigée dans *Gata4* qui empêche l'interaction de Gata4 avec les facteurs Fog démontrent des anomalies lors de la gonadogénèse (Tevosian *et al.*, 2002).

1.5.8 Les nombreux rôles de SF1

L'expression de *SF1* est nécessaire à trois moments différents lors de la détermination des testicules. Premièrement, *SF1* est impliqué dans les gonades bipotentielles juste avant la détermination du sexe. Chez la souris, l'expression de *Sf1* dans les crêtes génitales débute au jour e9 juste avant le début de l'expression de *Sry* (e10,5) et

disparaît à partir du jour e12,5 chez les femelles, alors qu'elle persiste dans les cellules de Sertoli (Ikeda *et al.*, 1994). Les souris déficientes en facteurs Sf1 n'ont pas de gonades, et par conséquent, elles développent un système génital interne et externe femelle (Luo *et al.*, 1994). De plus, SF1 est capable de lier et de transactiver *in vitro* les promoteurs *SRY* humain et porcin (Hossain et Saunders, 2001 ; de Santa Barbara *et al.*, 2001 ; Pilon *et al.*, 2003). Deuxièmement, SF1 contrôle l'expression de *MIS* dans les cellules de Sertoli. Chez l'humain, une certaine mutation hétérozygote dans le gène *SF1* est associée à une inversion de sexe mâle vers femelle complète (Achermann *et al.*, 1999). *In vitro*, cette mutation affecte la liaison entre SF1 et l'ADN et empêche la transactivation d'un gène rapporteur (promoteur *Cyp11a*). Ces faits portent à croire que SF1 a une implication dans la régulation de la régression des canaux de Müller par une action directe ou indirecte sur l'expression de l'hormone MIS (Giulini *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que SF1 pouvait lier et transactiver directement le promoteur *Mis* de souris en synergie avec WT1 (Nachtigal *et al.*, 1998) et qu'il interagissait directement avec SOX9 pour contrôler l'expression de *Mis* (de Santa Barbara *et al.*, 1998 ; Arango *et al.*, 1999). Finalement, SF1 serait nécessaire plus tard dans le développement des testicules au niveau des cellules de Leydig pour la production de stéroïdes. En effet, de nombreuses études ont démontré un rôle direct de SF1 dans la transactivation du gène *P450scc* et d'autres enzymes stéroïdogéniques (hydroxylases) (Clemens *et al.*, 1994 ; Takayama *et al.*, 1994 ; Morohashi *et al.*, 1994 ; Zhang et Mellon, 1996 ; Lynch *et al.*, 1993). De plus, des études *in vitro* ont démontré que SF1 était aussi impliqué dans le contrôle de l'expression du gène codant pour InsI3 (Insulin-like hormone 3), qui est un autre facteur sécrété par les cellules de Leydig et qui est impliqué dans la descente des testicules (Zimmermann *et al.*, 1998 ; 1999). Les nombreux rôles de SF1 à différents moments du développement des testicules démontrent à quel point la barrière entre la détermination et la différenciation des sexes n'est pas coupée au couteau.

1.5.9 Le rôle de DAX1 et la relation SF1/DAX1

Malgré les controverses, plusieurs études de cellules en culture et de souris transgéniques suggèrent que DAX1 inhibe la transcription d'un nombre de gènes qui sont

impliqués dans le développement sexuel mâle (Swain *et al.*, 1998). Quoiqu'il soit un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux, il ne possède pas un domaine de liaison à l'ADN qui contient des motifs en doigt de zinc. À la place, il contient un nouveau domaine dans la région N-terminale qui contient 3,5 répétitions d'un motif de fonction inconnue. Par contre, la liaison de la protéine DAX1 à l'ADN n'a encore jamais été démontrée. De plus, les mutations causant l'hypoplasie congénitale des surrénales sont retrouvées seulement au niveau du domaine de liaison au ligand dans la région C-terminale. Ces observations suggèrent que DAX1 n'agirait pas via une liaison directe à l'ADN, mais plutôt via une liaison avec une protéine qui lierait elle-même l'ADN. Ainsi, la protéine DAX-1 agirait davantage en tant que co-répresseur qu'en tant que répresseur. Des évidences biochimiques et des études de co-expression laissent croire que SF1 serait cette protéine de liaison (Ikeda *et al.*, 1996 ; Ito *et al.*, 1997). DAX1 est capable d'inhiber la transactivation exercée par SF1 via son domaine de répression en C-terminal et il peut interagir directement avec SF1, mais sans empêcher SF1 de se lier à l'ADN. Ainsi, il semble que DAX1 viendrait contrebalancer l'effet positif exercé par SF1 sur la transcription de *MIS* (Nachtigal *et al.*, 1998), et d'autres gènes importants pour la stéroïdogénèse (Lalli *et al.*, 1998).

Par ailleurs, DAX1 et SF1 sont aussi reliés à un autre niveau. Il semble que SF1 aurait la capacité de réguler l'expression de *DAX1*. En effet, des études ont déterminé que SF1 possédait un site consensus sur le promoteur de *DAX1* et qu'il était capable de transactiver le promoteur *in vitro* (Burris *et al.*, 1995 ; Ikeda *et al.*, 1996 ; Vilain *et al.*, 1997 ; Yu *et al.*, 1998b ; Kawabe *et al.*, 1999). C'est aussi le cas pour WT1 (Kim *et al.*, 1999).

Dans les gonades femelles en développement, la transcription de *DAX1* semble être activé par WNT4, un membre de la famille des signaux moléculaires WNT. Il a été montré antérieurement que la signalisation par WNT4 se faisait via la β -caténine et via une interaction avec SF1 sur le promoteur *DAX1* (Mizusaki *et al.*, 2003).

1.5.10 Au niveau de la différenciation des organes sexuels

Les bases de la différenciation sexuelle chez les mammifères nous viennent des travaux d'Alfred Jost (Jost, 1947) qui a démontré que les testicules doivent sécréter des substances permettant la conservation des canaux de Wolff et la régression des canaux de Müller. Selon ses expériences, la différenciation sexuelle chez la femelle devrait se faire selon une voie par défaut.

Aujourd'hui, chez le mâle, il est bien connu que la conservation des canaux de Wolff se fait grâce à la production et la sécrétion de la testostérone par les cellules de Leydig tandis que la régression des canaux de Müller est l'œuvre de la synthèse de l'hormone MIS par les cellules de Sertoli. La testostérone est aussi métabolisée en d'autres stéroïdes qui permettront la masculinisation des organes sexuels externes et de certaines parties du cerveau (Robert *et al.*, 1999). Une troisième hormone entre en ligne de compte pour la différenciation des organes. Il s'agit de InsL3 qui est sécrétée par les cellules de Leydig et qui est nécessaire pour la descente des testicules dans le scrotum (Zimmermann *et al.*, 1999). Le facteur SF1 est impliqué dans le contrôle de l'expression du gène codant pour InsL3 (Zimmermann *et al.*, 1998 ; 1999).

L'analyse des souris *Wnt4* *-/-* démontrent que *WNT-4* est nécessaire au développement des canaux de Müller chez les deux sexes, mais évidemment, cela ne peut qu'affecter la femelle puisque le mâle sécrète MIS pour les dégrader. Aussi, en absence de signalisation par *WNT4*, la stéroïdogénèse est initiée au niveau des ovaires. Une certaine quantité de testostérone peut donc être produite, ce qui permet la rétention et le développement des canaux de Wolff chez la femelle *Wnt4* *-/-*, mais cette quantité est insuffisante pour la masculinisation des organes sexuels externes. Des expériences très récentes ont démontré que *WNT4* avait un rôle à jouer au niveau de la vascularisation sex-spécifique et du recrutement des cellules stéroïdogéniques (Jeays-Ward *et al.*, 2003). Lors du développement des testicules, les cellules endothéliales migrent dans les gonades à partir du mésonéphros et forment le vaisseau sanguin coelomique. Aussi, les cellules de Leydig se différencient et produisent des hormones stéroïdiennes. Il n'en est rien dans les gonades

XX. Ainsi, WNT4 semble empêcher la migration des cellules endothéliales provenant du mésonéphros et il semble bloquer la migration des cellules stéroïdogéniques dans les gonades XX. Une déficience en *Wnt4* dans des testicules d'embryons de souris n'inhibe pas la formation du vaisseau coelomique, mais elle affecte son patron. Également, elle n'affecte pas la différenciation des cellules de Leydig. Finalement, il semble que WNT4 supportent le développement ovocytaire, car les souris *Wnt4*^{-/-} ont très peu d'ovocytes et ceux-ci sont en dégénérescence. En résumé, WNT4 est donc essentiel au développement du système reproducteur femelle en favorisant le développement des canaux de Müller, en inhibant la formation d'un bon réseau de vascularisation sanguine, en bloquant la migration des cellules stéroïdogéniques et en supportant le développement des ovocytes.

1.5.11 Schéma des processus de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères.

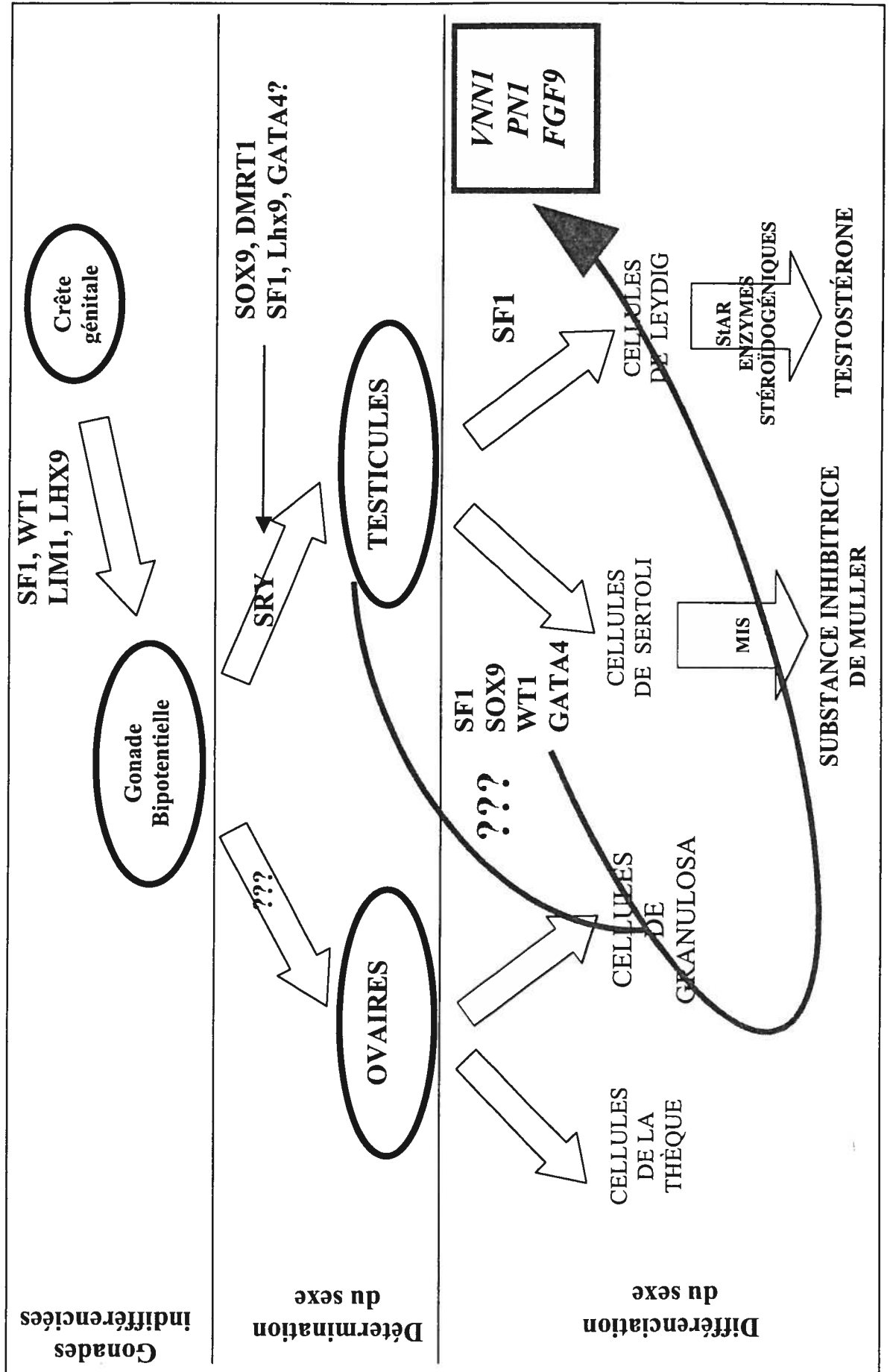
Un résumé des interactions possibles entre les facteurs identifiés comme étant impliqués dans le développement du système reproducteur est présenté à la figure 1.

1.6 NOUVEAUX GÈNES CANDIDATS POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS LORS DU DÉVELOPPEMENT DES TESTICULES.

1.6.1 Le gène *VNN1*

Des études d'expression de gènes dans les gonades de souris en développement (jours e12,5-e13,5) qui utilisent soit une méthode suppressive-soustractive (Bowles *et al.*, 2000), soit des microréseaux d'ADNc à haute densité (Grimmond *et al.*, 2000) ont suggéré l'implication du gène *Vnn1* dans la cascade de la détermination du sexe. Des études d'hybridation *in situ* sur des tissus de crêtes génitales d'embryon de souris démontrent un fort patron d'expression mâle-spécifique du gène *Vnn1* dans les cordons testiculaires et non

Figure 1. Modèle de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères.



dans les ovaires aux jours e12,5 et e13,5 (Bowles *et al.*, 2000, Grimmond *et al.*, 2000). L'expression débute au jour e12,25 (26 somites) au moment où *Sry* est exprimé de façon maximale et avant que les cordons testiculaires deviennent apparents (28 somites, e12,5). Au jour e13,5, les transcrits de *Vnn1* sont clairement localisés dans les cellules de Sertoli (Bowles *et al.*, 2000).

La protéine Vanin-1 est le membre prototype d'une grande famille de molécules qui est très conservée de la mouche *D. melanogaster* à l'humain. La famille Vanin est encodée par au moins deux gènes chez la souris (*Vanin-1* et *Vanin-3*), trois gènes orthologues chez l'humain (*VNN1*, *VNN2* et *VNN3*) et un gène chez la mouche *D. melanogaster* (Granjeaud *et al.*, 1999). Chez l'humain, les gènes *VNN* sont hautement conservés et intimement liés sur le chromosome 6q23-q24. Ils sont alignés selon la même orientation transcriptionnelle. Ils sont localisés dans une région lourdement réorganisée dans les cas de cancers humains métastatiques (Galland *et al.*, 1998). Chez la souris, les deux gènes *Vnn* sont localisés sur le chromosome 10A2B1. La localisation du gène *Vnn1* n'est associée à aucune anormalité lors du développement sexuel chez l'humain ou chez la souris.

Avant ces différentes études, la protéine Vanin-1 (Vascular noninflammatory molecule) était connue en tant que glycoprotéine d'ancrage à la surface cellulaire de type glycosylphosphatidylinositol (GPI) de 70 kDa. Cette glycoprotéine est exprimée dans les cellules épithéliales périvasculaires du thymus et elle serait impliquée lors de la colonisation du thymus par les précurseurs des cellules hématopoïétiques (Aurrand-Lions *et al.*, 1996). La protéine induirait l'immigration des cellules pre-B et pre-T de la circulation vers le thymus possiblement par son implication lors de l'adhésion et de la migration (Aurrand-Lions *et al.*, 1996). Aussi, il semblerait que la glycoprotéine Vanin-1 murine aurait une activité enzymatique pantetheinase (EC 3.5.1.-). La pantetheinase est une amidohydrolase qui catalyse l'hydrolyse de la D-pantetheine permettant ainsi le recyclage de la pantothenate (vitamine B5) et la génération d'un métabolite anti-oxydant, la cystéamine (Pitari *et al.*, 2000). Les souris déficientes en *Vanin-1* manquent de cystéamine dans leurs tissus (Pitari *et al.*, 2000). Par contre, il n'y a aucune indication dans la littérature

à propos de l'effet de la délétion du gène sur le développement des organes reproducteurs de ces souris.

L'expression du gène *Vnn1* dans les cellules de Sertoli, la fenêtre de temps durant laquelle il est exprimé dans les gonades mâles et le rôle que possède cette molécule dans le thymus suggèrent un rôle potentiel pour Vanin-1 dans la régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire effectuées sous l'action du facteur SRY dans le contexte des testicules en développement.

1.6.2 Le gène *PN1*

Un autre criblage des microréseaux d'ADNc à haute densité qui avaient permis d'identifier le gène *Vnn1* a permis de mettre en évidence le gène *Pn1* comme étant potentiellement impliqué dans la détermination du sexe (Grimmond *et al.*, 2000). Le gène *Pn1* démontre un patron d'expression mâle-spécifique dans les cordons testiculaires et non dans les ovaires aux jours e12,5 et e13,5 tout comme le gène *Vnn1*. L'expression débute au jour e11,25 (15 somites) et elle est clairement détectée au jour e13,5 dans les cellules de Sertoli (Grimmond *et al.*, 2000).

Le gène *PN1* code pour la protéine Nexin-1 qui est un inhibiteur de protéase sérine de 43-kDa qui peut moduler l'activité protéolytique de la thrombine, de la tPA, de la uPA et de la trypsine. Elle fait partie de la superfamille des inhibiteurs de protéase sérine (SERPINE). Chez la souris, cet inhibiteur est exprimé dans une grande variété de tissus embryonnaires, mais surtout dans le système nerveux en développement (Mansuy *et al.*, 1993). La localisation chromosomique du gène *PN1* chez l'humain (2q33-35) et chez la souris (MMU 10) n'est associée à aucune anormalité lors du développement sexuel chez ces espèces. Par contre, on retrouve une expression anormale de NEXIN-1 chez les hommes infertiles qui présentent des dysfonctions au niveau des vésicules séminales (Murer *et al.*, 2001). Chez la souris adulte, les plus hauts niveaux d'expression de Nexin-1 se retrouvent sous le contrôle des androgènes dans les vésicules séminales et le liquide

séminale (Vassalli *et al.*, 1993). Des souris mâles homozygotes pour la délétion du gène *Pn1* sont infertiles (Murer *et al.*, 2001). Cette infertilité ne serait pas causée par une altération au niveau de la spermatogénèse, ni à une mauvaise fonction du sperme, mais plutôt à une déficience dans la composition du fluide séminal. Comme l'activité protéolytique est augmentée en absence de l'inhibiteur Pn1, le liquide séminal est déficient en semenoclotine. Conséquemment, les bouchons muqueux sont malformés, ce qui diminue la probabilité des spermatozoïdes à atteindre l'utérus. En rapport avec les implications possibles de Nexin-1 dans la détermination du sexe, aucun fait n'a été mentionné par rapport au développement des organes reproducteurs chez ces souris infertiles.

Il a été postulé que lors du développement du mésencéphale et du myelencéphale, la régulation de la protéolyse par Nexin-1 pourrait servir à préserver la localisation des cellules avant leur migration et leur différenciation (Mansuy *et al.*, 1993). Lors de la formation des testicules, le dépôt de la lame basale qui entoure les cellules de Sertoli constitue la base de la structure des cordons testiculaires. Des expériences *in vitro* ont démontré que les cellules myoïdes pérutubulaires et les cellules de Sertoli coopèrent ensemble pour produire cette lame basale (Tung et Fritz, 1987). Ainsi, un inhibiteur de protéase comme Nexin-1, sécrété par les cellules de Sertoli pourrait contribuer à maintenir entre autre l'intégrité de la lame basale pendant les débuts de la formation des cordons testiculaires.

1.6.3 Le gène *FGF9*

L'observation de cas de réversion de sexe mâle vers femelle chez des souris « knock out » pour le gène *Fgf9* (fibroblast growth factor) a permis de l'identifier comme un candidat potentiellement impliqué lors de la détermination du sexe (Colvin *et al.*, 2001). Le système reproducteur des souris mâles *Fgf9* (-/-) arbore un phénotype féminin variable dès la naissance, allant d'une hypoplasie des testicules à la réversion complète du sexe. Chez les souris XY, les gonades ont un mésenchyme réduit et les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig sont mal différenciées ou tout simplement perdues lors du développement

embryonnaire. De plus, il y a absence de cellules myoïdes pérیتubulaires et les souris meurent à la naissance, due à une hypoplasie des poumons (Colvin *et al.*, 2001).

Les Fgfs composent une famille d'au moins 19 facteurs de croissance qui jouent des rôles clés dans une variété d'événements développementaux via une famille de quatre récepteurs tyrosine kinase (Ornitz *et al.*, 2001). L'expression du gène *Fgf9* est détectée dans plusieurs tissus durant l'embryogénèse chez la souris, soit dans le myocardium ventriculaire, la plèvre des poumons, les myoblastes squelettiques dans les bourgeons des membres, les neurones moteurs de la moëlle épinière et le bulbe olfactif (Colvin *et al.*, 1999). Certains Fgfs comme *Fgf9* sont aussi exprimés dans les tissus adultes et sont importants pour maintenir l'homéostasie dans ces tissus. Chez le rat adulte, *Fgf9* est exprimé dans le cerveau et les reins, mais pas dans le foie, les poumons, la rate, le thymus, les testicules, le cœur ou les glandes surrénales. Chez la souris, le gène *Fgf9* est localisé sur le chromosome 14 tandis que chez l'humain, il est situé sur le chromosome 13q-12.

Dans les gonades de souris normales, *Fgf9* est détecté aux jours e11,5 et e12,5 chez les embryons mâles, mais pas chez les embryons femelles. L'expression de *Fgf9* dans les gonades mâles débute peu de temps après le début de l'expression de *Sry* (jour e10,5). L'analyse de la prolifération chez les souris *Fgf9* (-/-) après le jour e12,5 démontre un taux de prolifération de moins de 70% par rapport au contrôle pour les cellules interstitielles. De plus, des expériences de migration en culture montrent que *Fgf9* induit directement ou indirectement la migration des cellules mésonephriques dans les gonades XX (Colvin *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que *Fgf9* agirait directement ou indirectement en aval de *Sry* pour stimuler la prolifération des cellules mésenchymateuses, la migration des cellules mésonephriques et la différenciation des cellules de Sertoli dans les testicules embryonnaires.

1.7 LE PORC COMME MODÈLE D'ÉTUDE DE LA DÉTERMINATION DU SEXE CHEZ LES MAMMIFÈRES.

Le système reproducteur nous offre un excellent modèle pour étudier le contrôle de l'organogenèse chez les mammifères, car c'est un système bipotentiel et les mutations génétiques qui l'affectent ne sont pas létaux et résultent plutôt en une altération du phénotype sexuel (inversion, hermaphrodisme ou encore stérilité). D'autre part, il existe de nos jours deux grands modèles pour mener ces études sur la détermination et la différenciation du sexe des mammifères, soit la souris et l'humain. La souris est le modèle le plus couramment utilisé pour l'analyse des processus de détermination et de différenciation du sexe et elle représente sans contredit, le meilleur modèle expérimental dû à la relative facilité avec laquelle des manipulations génétiques peuvent être réalisées. En raison des considérations éthiques concernant la manipulation d'embryons, les études développementales sont très difficiles chez l'humain. Par contre, l'humain est intéressant pour les cas cliniques de malformation ou d'inversion du sexe qui se produisent dans la nature. Afin de dresser un véritable portrait de ce qui se passe chez tous les mammifères, nous croyons que d'autres modèles animaux sont nécessaires. Le porc pourrait représenter un très bon modèle alternatif. Il est en effet relativement facile d'obtenir des embryons porcins à divers stades de développement (en quantité et de bonne qualité) et, la période de gestation du porc étant plus longue que celle de la souris (14 semaines versus 3 semaines), ils peuvent être obtenus à des stades embryonnaires plus précis. De plus, principalement au niveau de la détermination du sexe, la molécule SRY porcine a une structure beaucoup plus similaire à son homologue humain comparativement à celle de la souris (Daneau *et al.*, 1996). Cependant, avec le porc, les outils moléculaires et biologiques ne sont pas aussi disponibles que chez l'humain et la souris.

1.8 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Les principaux objectifs de ce mémoire ont été d'avancer les connaissances sur la régulation de trois gènes candidats (*VNN1*, *PNI* et *FGF9*) dans le cadre de la détermination du sexe chez le porc et de faire une analyse comparative de ces trois gènes entre trois espèces de mammifères, soit le porc, l'humain et la souris.

Pour atteindre nos objectifs, il a fallu avant tout développer des stratégies pour cloner rapidement les séquences codantes et les séquences génomiques des trois gènes à étudier (*VNN1*, *PN1* et *FGF9*) chez le porc. Une fois fait, il fallait insérer les séquences 5'flanquantes porcine des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* dans un vecteur en aval des séquences du marqueur GFP. Des études de co-transfection avec ces constructions dans des cellules CV-1 allaient nous permettre d'étudier l'effet de différents facteurs de transcription sur l'activité transcriptionnelle des séquences promotrices des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9*.

Nos hypothèses de travail étaient que l'expression des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* serait contrôlée directement par SRY ou indirectement par d'autres facteurs de transcription connus pour être impliqués lors de la détermination et de la différenciation des testicules, comme SOX9, SF1 et GATA4. De plus, des séquences régulatrices devaient pouvoir être identifiées à l'intérieur de ces gènes qui seraient communes à celles des gènes homologues retrouvés chez les autres espèces.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

2 MÉTHODOLOGIE

2.1 CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE *VNNI* PORCIN

2.1.1 Stratégie générale

Pour cloner l'ADNc complet du gène *VNNI* chez le porc, une stratégie basée sur la conservation des séquences codantes entre les espèces a été utilisée. Il est supposé que pour un gène donné, la séquence codante possède des similarités entre les séquences humaine, murine et porcine. Ainsi, suite à une comparaison des séquences humaine (GenBank #NM_004666) et murine (GenBank # NM_011704) disponibles sur le site internet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), des amorces dites hétérologues ont pu être synthétisés. Ces amorces ont permis de produire un premier fragment de la séquence codante totale du gène *VNNI* porcin. À partir de la séquence de ce premier fragment, il a été possible de synthétiser des amorces spécifiques pour compléter la séquence codante porcine en allant chercher les séquences des extrémités 3' et 5'.

2.1.2 Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène *VNNI* porcin

2.1.2.1 Récolte de tissus porcins

Suite à la nécropsie d'un porc mâle adulte, une portion corticale de rein a été prélevée et rapidement plongée dans l'azote liquide. Les tissus congelés ont ensuite été conservés dans un congélateur à -70°C , jusqu'au moment de l'extraction de l'ARN.

2.1.2.2 Extraction de l'ARN total de rein

L'ARN total de rein de porc adulte a été extrait par extraction au phénol acide et chloroforme selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) et a été isolé sur gradient de CsTFA. La concentration d'ARN des échantillons a été évaluée par densité optique. La

concentration d'acide nucléique est obtenue par densité optique (D.O.) prise à 260 et 280 nm. La lecture à 260 nm permet d'estimer la concentration d'acide nucléique et celle à 280 nm permet d'estimer la concentration de protéines. La concentration d'ARN est calculée en sachant qu'une unité de densité optique équivaut à 40µg/ml d'ARN, si c'est la concentration d'ADN qui est évaluée, une unité de densité optique équivaut à 50mg/ml d'ADN double brin (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.2.3 Amplification d'un premier fragment d'ADNc du gène *VNN1* porcin

2.1.2.3.1 *Transcription inverse (RT)*

La technique de transcription inverse a permis de produire l'ADNc du gène *VNN1* à partir de l'ARN total de rein de porc. Une amorce renversée VAN.1 (voir table I, p.52) complémentaire à une séquence du gène *VNN1* humain a été utilisée. Selon la méthode de RT, 1µg d'ARN total a été mélangé avec 1µl d'amorce antisens VAN.1. La réaction a été effectuée avec l'enzyme de transcription inversé Superscript II (Gibco BRL).

2.1.2.3.2 *Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*

L'ADNc a été ensuite amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Lors de la première réaction de PCR, on retrouve 1µl d'ADNc en présence de 1µl de l'amorce sens humaine VAN.A (20mM) (table I, p.52), 1µl de l'amorce antisens humaine VAN.1 (20mM) (table I, p.52), 10µl de tampon PCR 10X avec MgCl₂ fourni avec l'enzyme Expand High Fidelity® (Roche Molecular Biochemicals), 1µl d'une solution de nucléotides triphosphates (dNTP) (20µM de chaque nucléotide : adénosine triphosphate (dATP), cytosine triphosphate (dCTP), guanine triphosphate (dGTP), thymine triphosphate (dTTP); Pharmacia), 85.5µl d'eau stérile et deux gouttes d'huile minérale. La réaction se fait dans un volume total de 100µl dans un microtube de 0.5ml. La polymérase thermostable Expand High Fidelity® (0.5µl) est ajoutée au mélange lors du premier cycle au moment où la température atteint 72°C. Le microtube est ensuite incubé dans un appareil de PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) pendant 40 cycles de trois

Table I. Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène *VNN1* porcin. Le préfixe p indique que l'amorce a été créée à partir de la séquence porcine, le préfixe m à partir de la séquence de souris et le préfixe h à partir de la séquence humaine. Une lettre après le point indique qu'il s'agit d'une amorce sens, alors qu'un chiffre après le point indique une amorce antisens. Dans certains cas, des sites de restrictions enzymatiques ont été rajoutés à la séquence des amorces.

VAN.A

5' – ATATTATTGTGACTCCAGAAGATG

VAN.B

5' – TTACCAATACAACACTGATGTGGT

AgeI/K/pVAN.F

5' – ACCGGTACCATGATCACATCTCC

pVAN.J

5' – GAGCCACAAGTGGAAGTC

VAN.1

5' – CCTTCTCATACAACCTCCCAA

VAN.2

5' – AGGGAGAACATTTCAAACCTGGTA

pVAN.3

5' – GCCACAATGTAGATGGAGTTGTC

pVAN.4

5' – CAAGGGATCCAGTTCACGTGAG

pVAN.5

5' – TATGAGTAAATAGATTCCCTGCTG

pVAN.8

5' – GCTTTGCTGCTGACGTGACTGC

pVAN.9

5' – CCAGGGAGCTGGCTTTTAAGAC

pVAN.10

5' – GCCAGCAACGGAGATGTGATCA

pVAN.12

5' – CAGCAGCTGTAGCTCCGA

pVAN.13

5' – GGCATTACCATGAGCTGT

p5' VAN.D

5' – CTACTCAGTGTCTGTGAG

p5'VAN.E

5' – GATTCGTGCCCTCTTCTA

p5'VAN.F

5' – CCTGGCCACAATGCTTGCCTTTGCAGAGG

Kpn1/p5'VAN.G

5' – GGTACCGTCTCAGTAGTTAATGACTTTAAACGCTG

p5'VAN.3

5' – CATTCGTTTGGAGATTTCGCTTAGGATGG

p5'VAN.4

5' – GGTCACACTCTCAGCATATGAAAGTTCCC

p5' VAN.5

5' – GACCTGAAAACACGCTAC

p5' VAN.6

5' – CCTACAGTGTTCCCATTC

p5' VAN.7

5' – CCCAGCCAAGATCTCTGA

p5'VAN.8

5' – CTGTAGCCTGCCAGTCCC

p5'VAN.9

5' – CGCCACATAAGCCAGCAACGGAGATGT

Age1/p5'VAN.10

5' – ACCGGTCATGCTGAAGTCCAACAGCTGCTGAA

5'hVAN.A

5' – CGTTGACCTTTTTGTCTCTTCTCCCTCCTC

Not1/5'hVAN.B

5' – GCGGCCGCGATGCACTCTGCTAGACTCAGCTCTCACAG

Sal1/5'hVAN.1

5' – GTCGACGCTGAAGTCCAATGAGTGCTGAAAAACAGA

5'mVAN.D

5' – CTAATCTTTCATCACAAGCCTGTACACACC

Not1/5'mVAN.E

5' – GCGGCCGCCACAGTGCTCCAAGTTCAGAGTGCAAGTGG

5'mVAN.2

5' – CTGCAGCACACGCCAGCCACCAAGACATGC

Sal1/5'mVAN.3

5' – GTCGACCCCATAGACTGCGGGAAACCAAAACCTTGC

étapes : une première étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une deuxième étape d'appariement des amorces de 30 secondes à 60°C et finalement une étape d'élongation des brins d'ADN de 1 minute à 68°C. Suite à la première réaction de PCR (VAN.A1) et pour plus de spécificité, une deuxième réaction de PCR de type intégrée (« nested PCR ») a été faite. Cette fois-ci, 1µl de produit de la première réaction de PCR est ajouté avec 1µl d'amorce sens humaine VAN.B (20µM) (table I, p.52) et 1µl d'amorce antisens humaine VAN.2 (20µM) (table I, p.52). Tous les autres constituants du mélange (tampon, dNTP, eau, huile et enzyme) sont les mêmes retrouvés dans la première réaction de PCR. Le programme de PCR reste aussi inchangé.

2.1.2.4 Isolation des fragments d'ADNc amplifiés du gène *VNN1* porcin

Les produits amplifiés de la première et de la deuxième réaction de PCR ont été séparés selon la taille par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1%. Pour chaque réaction de PCR, un volume de 30µl d'amplicons mélangé avec 5µl de tampon de chargement 6X est mis sur gel. Les échantillons migrent en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire ϕ X 174 RF DNA Hae III (Amersham Pharmacia). Deux bandes sont visibles dans le cas de la première réaction de PCR (VAN.A 1), une d'environ 1230 pb et une autre d'environ 1000pb. Dans le cas de la deuxième réaction de PCR (VAN.B2), une bande majeure d'environ 800 pb a été identifiée.

2.1.2.5 Ligation des fragments d'ADNc amplifiés du gène *VNN1* porcin

Lors de l'amplification par PCR, la Taq polymérase qui se trouve dans le mélange enzymatique Expand High Fidelity® (Roche Molecular Biochemicals) ajoute un nucléotide adénosine au bout 3' des brins d'ADN amplifiés. Cet ajout permet de liguer le produit PCR directement dans le vecteur pGEM®-T (Promega). Ce vecteur qui est déjà coupé avec l'enzyme EcoRV porte une thymidine aux deux extrémités 3'. Ces thymidines augmentent l'efficacité de la ligation d'un produit PCR en empêchant la recircularisation du vecteur et en offrant des extrémités compatibles aux fragments amplifiés par la Taq polymérase Expand High Fidelity®. Les produits PCR VAN.A1 et VAN.B2 ont donc été ligués directement dans le vecteur pGEM®-T. Pour chaque réaction de ligation de 10µl de volume

final, 1µl de produit PCR a été ajouté à 5µl de tampon de ligation (2X) fournie par la compagnie, 3µl d'eau, 0.5µl de vecteur et 0.5µl d'enzyme T4 DNA ligase (Promega). Le tout a ensuite été incubé pendant la nuit à 16°C.

2.1.2.6 Transformation dans les bactéries compétentes

Les réactions de ligation ont été transformées de façon chimique dans des bactéries XL1-Blue rendues compétentes par le procédé au chlorure de rubidium.

2.1.2.6.1 Bactéries compétentes pour la transformation chimique

Afin d'obtenir des bactéries perméables à l'ADN plasmidique, la souche bactérienne *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) a été traitée par un procédé chimique au chlorure de rubidium (RbCl₂) (Sambrook *et al.*, 1989). Cette technique a permis de produire environ 10⁷ à 10⁸ transformants par mg d'ADN plasmidique.

2.1.2.6.2 Transformation des bactéries compétentes

Une fois rendue compétentes, 200µl de bactéries XL1-Blue ont été employées pour la transformation chimique de chaque ligation. Les bactéries ont été étalées sur des pétris de LB contenant de l'ampicilline (0.5mg/ml), du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (80mg/ml ; Gibco BRL) et de l'IPTG (isopropyl-β-D-galactopyranoside) (8mg/ml ; Gibco BRL) dans le but de permettre la sélection colorimétrique des clones qui posséderont le vecteur pGEM®-T avec un insert.

2.1.2.7 Sélection des clones recombinants

À titre de première sélection, l'ampicilline dans le milieu va éliminer toutes les bactéries qui n'auront pas incorporé le vecteur pGEM®-T. En fait, le vecteur pGEM®-T qui porte le gène de résistance à l'ampicilline va permettre aux bactéries qui acceptent le plasmide d'acquérir la résistance à cet antibiotique.

Comme deuxième moyen de sélection, le système de coloration X-Gal va permettre de sélectionner les clones qui auront acquis un plasmide avec insert parmi ceux qui contiendront uniquement le vecteur pGEM®-T. Ceci est possible en raison du fait que le plasmide pGEM®-T possède un fragment contenant les 146 premiers acides aminés de la partie amino-terminale du gène de la β -galactosidase (LacZ). Le site de clonage multiple est en plein cœur de ce fragment, mais il n'affecte pas le cadre de lecture. En présence de X-Gal, une coloration bleue des colonies est produite dû à l' α -complémentation de la partie amino-terminale du gène LacZ qui provient du vecteur avec la partie C-terminale du même gène qui est générée par le génome des bactéries hôtes. Lorsqu'un fragment d'ADN étranger est inséré dans le site de clonage multiple du plasmide, il interrompt la séquence de la portion amino-terminale du gène et empêche la possibilité de constituer un gène LacZ fonctionnel suite à l' α -complémentation (Sambrook *et al.* 1989). Les colonies restent donc blanches.

2.1.2.8 Mini-préparation d'ADN plasmidique

Les colonies bactériennes blanches ont étéensemencées dans 3 ml de milieu de culture LB contenant de l'ampicilline (0.5mg/ml). Après une incubation à 37°C avec agitation (250 rpm) pendant la nuit, l'ADN plasmidique a été récupéré à l'aide de colonnes fournies par la trousse «QIAprep Spin Miniprep » (QIAGEN #Cat 27106). L'ADN plasmidique a été dissoute dans 50µl de tampon d'élution EB fourni par la compagnie. La présence d'un insert dans le plasmide a été confirmée par une double digestion avec les enzymes Pst I et Sac II (Pharmacia). Pour chaque clone, 5µl d'ADN plasmidique a été ajouté à un mélange de 3µl de tampon High (10X) (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100µg/ml BSA, 100mM NaCl), 21µl d'eau et 0.5µl de chaque enzyme. Les ADN ont été digérés à 37°C pendant au moins 1 heure. Finalement, ils ont été séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans un tampon TAE (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.2.9 Séquençage d'ADN double brin

Après la digestion, trois clones qui possédaient un insert à la taille prévue ont été séquencés dans le but de vérifier s'ils possédaient bel et bien un fragment d'ADNc porcin du gène *VNN1*. Le séquençage a été possible grâce au service de séquençage établi à la Faculté de Médecine Vétérinaire. Le service utilise les appareils de type ABI Prism® 310 Genetic Analyzer de la compagnie Applied Biosystems®. Les oligonucléotides SP6 et T7 (table II, p.59), spécifiques au vecteur pGEM®-T ont été utilisés pour le séquençage à une concentration de 1µM. Pour une réaction de séquence, 3µl d'échantillon d'ADN plasmidique à une concentration finale de 100ng/µl a été nécessaire. Les concentrations des mini-préparations des clones positifs ont été préalablement évaluées à une D.O. de 260 et 280 nm selon la méthode décrite à la section 2.1.2.2 et les échantillons et les amorces ont été dilués dans l'eau.

2.1.3 Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène *VNN1* porcin

2.1.3.1 Amplification de l'extrémité 3' du gène *VNN1* porcin

En premier lieu, une RT à partir de 1µg d'ARN total de rein de porc mâle a été faite à l'aide de 1µl d'une amorce renversée constituée de plusieurs thymidines (ADT₇T₁₇) (table II, p.59). Cette amorce se fixe spécifiquement à la queue poly(A)+ de l'ARNm. Suite à la RT, un premier PCR a été fait sur 1µl d'ADNc à l'aide de 1µl d'amorce hétérologue sens VAN.A (20µM) (table I, p.52) et de 1µl d'amorce antisens ADB,H,E (20µM) (table II, p.59). Ce dernier oligonucléotide contient la séquence de l'amorce ADT₇T₁₇ à laquelle a été rajoutée à l'extrémité 3' des sites de restriction (EcoRI, BamHI et HindIII). Les autres composantes de la réaction PCR ainsi que les conditions de cyclage sont les mêmes que celles décrites à la section 2.1.2.3.2. Le temps d'élongation est par contre allongé à 3 minutes. Afin d'augmenter la spécificité, un PCR intégré a été réalisé avec 1µl des amorces VAN.B (20µM)(table I, p.52) et ADE,T₇ (20µM)(table II, p.59).

Table II. Séquences d'amorces diverses utilisées pour le clonage et le séquençage des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9*.

Sp6

5'-GATTTAGGTGACACTATAG

T7

5'-TAATACGACTCACTATAGGG

ADT₇T₁₇5'-GGATCCAAGCTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTTTTTTTTTTTTTT
TT**AD.B,H,E**

5'-GGATCCAAGCTTGAATTCTAATACG

AD.E,T₇

5'-GAATTCTAATACGACTCACTATAGGG

βGAL.1

5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG

βGAL.2

5'-ACACAGGAAACAGCTATGACCATG

βGAL.A

5'-AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG

βGAL.B

5'-TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA

pIZZA.A

5'-GTTATCCCCTGATTCTGT

EGFP.3

5'-GAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCA

2.1.3.2 Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène *VNN1* porcin

30µl de chaque produit de PCR ont été séparé selon la taille des fragments par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1%. Les échantillons ont migré en parallèle avec une échelle qui combine les échelles Lambda DNA HindIII et ϕ X 174 RF DNA Hae III (Amersham Pharmacia). Une bande majeure d'environ 2000pb est visible dans la première réaction de PCR (VAN.A-ADB,H,E). Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée.

2.1.4 Clonage de l'extrémité 5' non- transcrite de l'ADNc du gène *VNN1* porcin

2.1.4.1 Isolation d'ARN poly(A)+ de rein

À partir de l'ARN total de rein de porc mâle, l'ARNm a été isolé à l'aide de la trousse commerciale «Dynabead Oligo(dT)25 » de la compagnie Dynal. Une amorce d'oligonucléotides (dT) fixée à des billes magnétiques en polystyrène s'hybride à la queue poly(A)+ de l'ARNm. Quelques lavages sont nécessaires pour éliminer le matériel non lié. Par la suite, l'ARNm est élué des billes de façon thermique à l'aide d'un tampon d'élution (2M EDTA).

2.1.4.2 Synthèse du premier brin d'ADNc du gène *VNN1* porcin

À partir de cette étape, la recherche de l'extrémité 5' non-transcrit de l'ADNc s'est réalisée à l'aide de la trousse « 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 » commercialisée par Gibco BRL (# Cat 18374-058). Tous les détails des protocoles suivants se retrouvent dans le guide d'instruction fourni avec la trousse.

Une RT a été faite à partir de 5µg d'ARN poly(A)+ en présence de 0.5µl d'amorce renversée pVAN.3 (table I, p.52). Cette amorce spécifique découle de la séquence du bout le plus 5' du premier fragment d'ADNc porcin cloné du gène *VNN1*. La réaction de

transcription inverse s'est faite avec l'enzyme Superscript™ II à 42°C pendant 30 minutes. À la fin de la réaction, l'ARN a été dégradé par 1µl d'un mélange de RNases afin d'augmenter l'efficacité de la réaction d'addition de la queue poly (dC) par la TdT. La TdT démontre une préférence marquée pour les substrats simple-brin (manuel Gibco).

2.1.4.3 Purification de l'ADNc du gène *VNNI* porcin

Les résidus d'amorces peuvent nuire à la bonne formation de la queue poly(dC) et entrer en compétition avec l'amorce commerciale «Abridged Anchor Primer » lors de la réaction PCR. Afin d'enlever l'excès de nucléotides et d'amorces pVAN.3, l'ADNc a été purifié grâce à des colonnes « GlassMAX DNA isolation spin cartridge » fournies par la trousse 5'RACE (Gibco BRL).

2.1.4.4 Addition d'une queue poly (dC) à l'ADNc du gène *VNNI* porcin

L'addition d'une queue poly(dC) à l'extrémité 3' de l'ADNc crée un site de liaison pour l'amorce commerciale «Abridged Anchor Primer » (AAP) lors de la réaction de PCR. Pour ce faire, 15µl d'ADNc purifié a été mélangé avec 1,5µl d'eau DEPC, 5µl de tampon 5X, 2,5µl de dCTP (2µM) et 1µl de TdT. Le tout a été incubé pendant 10 minutes à 37°C. La TdT a ensuite été inactivée à 65°C pendant 10 minutes.

2.1.4.5 Amplification du bout 5' non- transcrit de l'ADNc du gène *VNNI* porcin par PCR

Pour aller chercher le fragment 5', une première réaction de PCR a été réalisée à partir de 5µl d'ADNc-3'poly(dC) en présence de 1µl d'amorces sens pVAN.4 (20µM) (table I, p.52), 2µl d'amorces commerciales «Abridged Anchor Primer » (AAP) (10µM) fournies par la trousse 5'RACE, 5µl de tampon PCR 10X avec MgCl₂ fournit avec l'enzyme, 1µl de dNTP (10mM), 35.3µl d'eau stérile et 0.7µl d'enzyme Expand High Fidelity® (3.5U/µl) (Roche Molecular Biochemicals). Le tout a été reconstitué dans un volume final de 50µl. Les conditions de la première réaction de PCR ont été les suivantes :

une étape de dénaturation des brins à 94°C pendant 30 secondes, une étape d'appariement des amorces à 55°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 68°C pendant 90 secondes. Ce cycle a été répété 35 fois.

Pour plus de spécificité, une réaction de PCR de type intégré a été faite sur le produit de la première réaction de PCR (pVAN.4-AAP). Une dilution 1/10 du premier produit de PCR dans 10mM Tris-HCl pH8.0 a été préalablement obtenue et 1µl de cette dilution a été incorporé dans le mélange à PCR. Cette fois-ci, les amorces pVAN.5 (20µM) (table I, p.52) et «Abridged Universal Amplification Primer » (AUAP) (10µM) ont été utilisées pour l'amplification. L'amorce AUAP qui est fournie par la trousse 5'RACE reconnaît la séquence de l'amorce AAP qui contient les sites de restriction MluI, SalI et SpeI. La deuxième réaction (pVAN.5-AUAP) a été faite dans les mêmes conditions que la première.

2.1.4.6 Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène *VNNI* porcin

20µl d'amplicons de chaque réaction de PCR ont été mis sur gel d'agarose 1% afin de visualiser les fragments amplifiés. Les échantillons ont migré en parallèle avec une échelle qui combine les échelles Lambda DNA HindIII et ϕ X 174 RF DNA Hae III (Amersham Pharmacia). Dans le cas de la première réaction de PCR (pVAN.4-AAP), une bande à environ 450pb a été identifiée. Dans le cas de la deuxième réaction de PCR (pVAN.5-AUAP), une grosse bande à environ 400pb a pu être déterminée. La ligation dans le vecteur pGEM®-T s'est faite directement à partir du produit de PCR pVAN.5-AUAP.

2.2 CLONAGE DES SÉQUENCES GÉNOMIQUES DU BOUT 5' DU GÈNE *VNNI* PORCIN

2.2.1 Stratégie générale

Deux différentes sortes de mini-librairies ont été construites dans le but de repêcher des fragments d'ADN génomique qui constituent l'extrémité 5' du gène *VNNI* porcin. Un premier criblage de la mini-génothèque d'ADN génomique de tailles sélectionnées a permis le clonage d'un fragment de 1,9kb en amont de l'ATG du gène. Afin d'obtenir plus de séquence en 5', un autre criblage cette fois à partir des quatre mini-librairies d'ADN génomique non-clonées a permis le clonage d'un fragment de 3,3kb situé en amont du premier fragment. Le séquençage de ces deux fragments a permis d'obtenir une séquence totale de 5kb du bout 5' génomique du gène *VNNI* porcin.

2.2.2 Clonage d'un premier fragment d'ADN génomique 5' de 1,9kb en amont de l'ATG du gène *VNNI* porcin

2.2.2.1 Immunobuvardage de type Southern

2.2.2.1.1 *Production et marquage radioactif de la sonde*

Un fragment d'ADN qui contient 210pb en amont du codon de début de transcription (ATG) du gène *VNNI* porcin a été amplifié afin de produire une sonde. Selon la comparaison entre les séquences génomiques humaine et murine pour le gène *VNNI*, il a été prédit que le fragment porcin porte seulement des séquences de l'exon 1 du gène. À partir des séquences de la région 5' de l'ADNc porcin, des amorces ont été synthétisées soit AgeI/K/pVAN.F (20µM) et pVAN.8 (20µM) (table I, p.52) pour amplifier la sonde à une température d'appariement de 55°C.

Le marquage a été réalisé en utilisant le système «Megaprime™ DNA labelling » commercialisé par Amersham LIFE SCIENCE. Cette technique permet l'incorporation de dCTP³² radioactif à l'aide de la polymérase Klenow. 50µg de fragment d'ADN a été utilisé pour le marquage radioactif. La sonde a ensuite été purifiée grâce à la trousse «QIAquick Nucleotide Removal kit » commercialisé par QIAGEN (# Cat 28304).

2.2.2.1.2 *Préparation de l'ADN génomique de porc*

L'ADN génomique a été isolé à partir d'un rein de porc mâle adulte à l'aide d'une trousse « Blood and Cell Culture DNA Maxi kit » de la compagnie QIAGEN (# Cat 13362). La concentration d'ADN de l'échantillon a été évaluée selon la méthode habituelle (voir section 2.1.2.2).

L'ADN génomique a ensuite été digéré par différentes enzymes de restriction (BamHI, ClaI, EcoRI, HindIII, PstI, SacII, XhoI, SalI, KpnI et XbaI). Pour chaque enzyme, 10µg d'ADN a été mis à digérer (voir Annexe, p.250). Après une nuit à 37°C pour une digestion complète, l'ADN a été séparé selon la taille par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0.8%. Avant de transférer l'ADN sur la membrane, le gel a été trempé dans une solution de dépurination (250mM HCl) pendant 10 minutes et il a été rincé 3 fois avec de l'eau distillée. Ensuite, il a été plongé dans une solution dénaturante (1.5M NaCl et 0.5M NaOH) pendant 45 minutes et finalement dans une solution de neutralisation (1M Tris (pH7.4) et 1.5M NaOH) pendant 45 minutes afin de rétablir le pH.

2.2.2.1.3 *Transfert de l'ADN génomique de porc sur la membrane*

L'ADN génomique a été transféré sur une membrane de nylon neutre (Hybond-N™, Amersham) par capillarité en utilisant un tampon de transfert neutre (10X SSC). L'ADN a été fixé à la membrane par les irradiations aux rayons ultraviolets de 15j/cm² émis par un appareil SpectroLinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corporation).

2.2.2.1.4 *Préhybridation, hybridation et détection*

La préhybridation de la membrane a été effectuée dans un tampon de préhybridation (5X SSC, 1.0% (w/v) « Blocking Reagent », 0.1% N-laurylsarcosine et 0.02% SDS) pendant 4 heures à 65°C dans un four à hybridation rotatif.

L'hybridation de la membrane a été effectuée pendant 18 heures à 65°C dans 7 ml de tampon d'hybridation. Le tampon d'hybridation était du tampon de préhybridation dans

lequel avait été ajoutée la sonde marquée au P^{32} (210 pb d'une portion de l'exon1 du gène *VNN-1*) préalablement dénaturée par ébullition pendant 10 minutes.

La membrane a ensuite été lavée 1 fois avec une solution de 2X SSC et 0.1% SDS à la température de la pièce, 2 fois à 65°C pendant 20 minutes avec cette même solution et finalement 2 fois à 65°C pendant 20 minutes avec une solution de 0.1X SSC et 0.1% SDS. La membrane a été exposée avec un film radiographique (Kodak) pendant 2 jours à -70°C.

2.2.2.2 Création de la mini-génothèque de taille sélectionnée porcine

La technique d'immunobuvardage de type Southern a permis l'identification d'un seul fragment d'une taille de 3kb pour l'ADN digéré avec l'enzyme de restriction *PstI*. C'est à partir de ce fragment que s'est basée la création de la mini-génothèque.

2.2.2.2.1 *Digestion industrielle de l'ADN génomique de porc avec PstI*

Dans un volume final de 1200µl, 200µg d'ADN génomique de porc a été digéré avec l'enzyme *PstI* (Pharmacia) dans du tampon Low 10X (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂ et 100µg/ml BSA). La digestion a été faite à une température de 37°C pendant toute une nuit afin qu'elle soit complète. Les fragments d'ADN ont ensuite été séparés selon la taille par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0.8%. À l'aide du marqueur de poids moléculaire «1kb ladder » (Gibco BRL), les bandes qui avaient une taille sélectionnée allant de 2 à 4kb ont été excisées et extraites du gel. La trousse «QIAquick Gel Extraction kit » de la compagnie QIAGEN (#Cat 28704) a été utilisée pour exécuter l'extraction des fragments d'ADN.

2.2.2.2.2 *Ligation de la mini-génothèque de taille sélectionnée porcine*

Les fragments d'ADN de taille sélectionnée (2-4kb) ont été insérés dans un vecteur de clonage Bluescript KS(+) (Stratagene). Pour ce faire, le vecteur a été préalablement coupé avec l'enzyme *PstI* dans 2X de tampon «One Phor All » (Pharmacia) pendant 4

heures à 37°C. Un traitement de l'ADN à l'alkaline phosphatase intestinale de veau (Pharmacia) a été effectué pour en retirer le résidu phosphate à son extrémité 5'. La déphosphorylation du vecteur s'est fait selon les recommandations de la compagnie Pharmacia et la récupération du vecteur déphosphorylé a été faite avec les colonnes de la trousse « QIAquick Gel Extraction kit » de la compagnie QIAGEN (#Cat 28704). La ligation entre les fragments (2-4kb) d'ADN génomique et le vecteur Bluescript KS(+) a été produite à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase dans le tampon « One Phor All » (1X) pendant la nuit à 16°C.

2.2.2.3 Amplification de séquences génomiques en amont de l'ATG du gène *VNN1* porcin

Pour cloner les séquences génomiques en amont de l'ATG du gène *VNN1*, différents PCR ont été réalisés sur la mini-génothèque d'ADN génomique porcine (2-4kb). Étant donné que l'orientation des fragments d'ADN dans le vecteur Bluescript KS(+) n'est pas connue, des amorces spécifiques au vecteur situées de part et d'autre du site de clonage multiple ont été utilisées pour tenter d'amplifier une séquence. Ainsi, lors d'une première réaction de PCR, un tube contenait 1µl de mini-génothèque en présence des amorces βGAL.A (table II, p.59) et pVAN.9 (table I, p.52) et un autre tube contenait 1µl de mini-génothèque en présence des amorces βGAL.1 (table II, p.59) et pVAN.9 (table I, p.52). Les deux tubes ont été soumis à 40 cycles de PCR : dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, appariement des amorces à 62°C pendant 45 secondes et élongation à 68°C pendant 4 minutes. La polymérase Expand High Fidelity® (Roche) a été utilisée pour la réaction. Pour plus de spécificité, une deuxième réaction de PCR de type emboîtée a été effectuée sur 1µl de chaque produit de la première réaction. Le produit βGAL.A-pVAN.9 a été mis en présence des amorces βGAL.B (table II, p.59) et pVAN.10 (table I, p.52) et le produit βGAL.1-pVAN.9 a été mis en présence des amorces βGAL.2 (table II, p.59) et pVAN.10 (table I, p.52). Les conditions de réaction sont les mêmes que celles décrites quelques lignes plus haut.

2.2.2.4 Isolation des fragments génomiques 5' du gène *VNN1* porcin

Une bande significative de la taille d'environ 2kb a été détectée pour le produit de PCR β GAL.2-pVAN.10. Elle a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée. En plus des amorces du vecteur pGEM®-T, Sp6 et ApaI (table II, p.59), des amorces spécifiques internes ont été utilisées afin d'obtenir une séquence complète : pVAN.J, pVAN.12 et pVAN.13 (table I, p.52).

2.2.3 Clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique 5' en amont du premier fragment d'ADN génomique 5' du gène *VNN1* porcin

2.2.3.1 Création de mini-librairies d'ADN génomique porcin non-clonées

Dans la perspective d'avoir une séquence génomique 5' du gène *VNN1* porcin plus longue, une trousse commerciale appelée «Universal GenomeWalker™ Kit » (Clontech) a été employée. La technique consiste à cloner rapidement des séquences génomiques par PCR grâce à la création de mini-librairies porcines non-clonées. Contrairement à la mini-génothèque de tailles sélectionnées utilisée pour le clonage du fragment β GAL.2-pVAN.10, les mini-librairies rendent disponibles tout le génome du porc pour le criblage par PCR.

2.2.3.1.1 Préparation de l'ADN génomique de porc

L'ADN génomique a été isolé à partir d'un rein de porc mâle adulte à l'aide d'une trousse «Blood and Cell Culture DNA Maxi kit » de la compagnie QIAGEN (# Cat 13362). La concentration d'ADN de l'échantillon a été évaluée selon la méthode habituelle (voir section 2.1.2.2).

Quatre enzymes de restriction qui laissent des extrémités franches (DraI, EcoRV, PvuII et StuI) ont été employées pour digérer chacune 5 μ g d'ADN génomique dans leurs tampons 10X respectifs. Les enzymes et leur tampon 10X sont fournis par la trousse de Clontech. Pour obtenir des digestions complètes, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 16 heures. Dans le but d'éliminer toute trace d'enzyme de restriction, les digestions ont été purifiées par une extraction au phénol/chloroforme et précipitées à l'éthanol (voir

instructions de la trousse de Clontech). Les culots d'ADN génomique ont été resuspendus dans 20µl de TE (10mM Tris-HCl (pH7.5) et 0.1mM EDTA) avant la ligation.

2.2.3.1.2 Ligation des différentes digestions d'ADN génomique de porc

Les différentes digestions d'ADN génomique ont été liguées à l'aide des adaptateurs «GenomeWalker adaptor » fournis par la trousse. 10µl d'ADN de chaque digestion a été ligué avec 1,9µl d'adaptateurs dans un tampon de ligation 10X à l'aide de la T4 DNA ligase pendant la nuit à 16°C. Ces ligations ont constitué les 4 mini-librairies d'ADN génomique porcines. Voir les instructions de la trousse «Universal GenomeWalker™ Kit » de Clontech pour plus de détails.

2.2.3.2 Amplification de séquences génomiques en amont de la séquence du premier fragment de promoteur du gène *VNN1* porcin

Des criblages par PCR des mini-librairies porcines non-clonées ont été faits pour cloner un fragment en amont du premier fragment cloné βGAL.2-pVAN.10. Pour cette recherche, des amorces antisens spécifiques à la région 5' du fragment βGAL.2-pVAN.10 ont été synthétisées. Elles ont été utilisées de concert avec des amorces sens fournies par la trousse « Universal GenomeWalker™ Kit » qui reconnaissent les séquences des adaptateurs. Dans la première réaction de PCR, 1µl de mini-librairie a été mis en présence de 1µl d'amorce AP1 (adaptor primer 1) (10µM), de 0,5µl d'amorce p5'VAN.3 (20µM)(table I, p.52), de 0,5ml de dNTPs (25mM), de 2,2ml de Mg(OAc)₂ (25mM), de 5µl de tampon de PCR Advantage 2® 10X (Clontech), de 39,8µl d'eau stérile et de 1µl d'enzyme Advantage 2® (Clontech). Les conditions de PCR ont été ceux-ci : 7 cycles qui comprennent une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 secondes et une étape d'appariement et d'élongation à 72°C pendant 3 minutes suivies de 32 cycles qui comprennent une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 secondes et une étape d'appariement et d'élongation à 67°C pendant 3 minutes. Une autre réaction de PCR de type intégrée a été faite à partir de 1ml de produit de PCR AP1-p5'VAN.3. Cette fois-ci, les amorces p5'VAN.4 (20µM)(table I, p.52) et AP2 (adaptor primer 2) (10µM) ont été

utilisées pour amplifier les fragments. Le programme du deuxième PCR a été celui-ci : 5 cycles qui comprennent une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 secondes et une étape d'appariement et d'élongation à 72°C pendant 3 minutes suivies de 20 cycles qui comprennent une étape de dénaturation à 94°C pendant 2 secondes et une étape d'appariement et d'élongation à 67°C pendant 3 minutes.

2.2.3.3 Isolation des fragments génomiques 5' du gène *VNN1* porcin

Différents fragments ont pu être observés selon la mini-librairie criblée. Avec la mini-librairie digérée par l'enzyme *StuI*, une bande de la taille d'environ 3,3kb a été identifiée, de même que pour la mini-librairie digérée par l'enzyme *DraI*. Un plus petit fragment d'environ 1.8kb a été observé pour la mini-librairie *PvuII*.

2.2.3.4 Ligation et transformation du fragment de 3.3kb de la mini-librairie *StuI*

Étant donné que le fragment de 3,3kb amplifié à partir de la mini-librairie *StuI* semblait contenir le plus de séquence génomique 5', c'est lui qui a été favorisé pour la ligation et la transformation. L'enzyme Advantage 2® permet à l'amplicon de se liguer directement dans le vecteur pGEM®-T tout comme l'enzyme Taq polymérase Expand High Fidelity®. Lors du séquençage, en plus des amorces du vecteur pGEM®-T, Sp6 et T7, des amorces spécifiques internes ont été utilisées afin d'obtenir une séquence complète : p5'VAN.D, p5'VAN.E, p5'VAN.5, p5'VAN.6, p5'VAN.7 et p5'VAN.8 (table I, p.52).

2.3 CLONAGE DE 5kb DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE *VNN1* PORCIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (construction 5kb pVANp-GFP).

2.3.1 Amplification de 5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène *VNN1* porcin

Grâce au séquençage complet des deux fragments génomiques 5', des amorces ont été synthétisées de façon à pouvoir amplifier un seul grand fragment génomique 5' de 5kb. Ainsi, un premier PCR a été réalisé sur 1µl d'ADN génomique de rein de porc mâle en présence d'une amorce sens p5'VAN.F (20µM) (table I, p.52) et d'une amorce antisens p5'VAN.9 (20µM) (table I, p.52). Voir la section 2.2.3.2. pour les détails de la préparation des réactions de PCR avec l'enzyme Advantage2® (Clontech). La réaction de PCR s'est faite en deux étapes sur 35 cycles: une de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes et une à 68°C pendant 6 minutes qui comprend l'appariement et l'élongation. Pour plus de spécificité, un deuxième PCR de type intégré a été fait sur 1µl du produit de PCR p5'VAN.F-p5'VAN.9. Les amorces KpnI/p5'VAN.G (20µM) (table I, p.52) et AgeI/p5'VAN.10 (20µM) (table I, p.52) ont été utilisées dans ce cas-ci dans les mêmes conditions que le premier PCR. Par contre, la réaction a été faite pendant 30 cycles et à une température d'appariement/élongation de 70°C.

2.3.2 Isolation du fragment de 5kb d'ADN génomique 5' du gène

***VNN1* porcin**

Une bande de taille prévue de 5kb a été détectée pour le deuxième produit de PCR KpnI/p5'VAN.G-AgeI/p5'VAN.10. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T

2.3.3 Préparation et ligation de l'insert génomique 5' de 5kb du gène

***VNN1* porcin dans le vecteur d'expression pEGFP-1**

Un 15µl d'un plasmide pGEM®-T qui possédait l'insert génomique de 5kb a été digéré avec les enzymes KpnI et AgeI (Promega) dans le tampon K 10X (Promega). En parallèle, 5µl de vecteur EGFP-1home mod. Xba (pEGFP-1) a été digéré avec les mêmes enzymes. Les digestions ont été incubées pendant 3 heures à 37°C et ont été séparées par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. L'insert de 5kb, ainsi que le vecteur ont été extraits du gel à l'aide de la trousse « QIAquick Gel Extraction kit »(QIAGEN). La ligation s'est faite

dans le tampon de ligation 2X (Promega) avec la T4 DNA ligase (Promega) à 16°C pendant la nuit.

2.3.4 Transformation dans les bactéries compétentes

La transformation a été effectuée dans 50µl de cellules XL1-Blue déjà compétentes commercialisées par Stratagene. Les bactéries ont été étalées sur des pétris de LB qui contenait de la kanamycine (0.5mg/ml) comme antibiotique. Les pétris ont été incubés à l'envers pendant la nuit à 37°C.

2.3.5 Sélection des recombinants et mini-préparations d'ADN plasmidique.

Sur pétri, le seul moyen de sélection possible est la résistance à la kanamycine que confère le vecteur pEGFP-1 aux bactéries qui l'auront acquis. Les colonies sont toutes blanches étant donné que le vecteur pEGFP-1 ne permet pas un système de sélection par la coloration comme le fait le vecteur pGEM®-T. Ainsi, des colonies blanches ont été ensemencées dans 3 ml de bouillon LB contenant de la kanamycine (0,5mg/ml) et ont été incubées pendant la nuit avec agitation constante (250 rpm) à 37°C. L'ADN plasmidique a été récupéré à l'aide de colonnes fournies par la trousse QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN #Cat 27106). L'ADN plasmidique a été dissoute dans 50µl de tampon d'élution EB fournie par la compagnie. La présence de l'insert de 5kb dans les plasmides a été confirmée par une double digestion avec les enzymes AgeI et KpnI (Promega) dans le tampon K 10X (Promega). Finalement, ils ont été séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

2.3.6 Confirmation des clones positifs par séquençage

Les amorces utilisées pour le séquençage dans le vecteur pEGFP-1 sont pIZZA.A (1µM)(table II, p.59) et EGFP.3 (1µM)(table II, p.59).

2.4 CLONAGE DE 5kb DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE *VNN1* HUMAIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (construction 5kb hVANp-GFP).

2.4.1 Amplification de 5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène *VNN1* humain

L'ADN génomique humain a été isolé à partir de sang humain mâle adulte consentant selon les instructions de la trousse «Blood and Cell Culture DNA Maxi kit » de la compagnie QIAGEN (# Cat 13362). La concentration d'ADN de l'échantillon a été évaluée selon la méthode habituelle (voir section 2.1.2.2). À partir des séquences promotrices du gène *VNN1* humain disponibles sur le site //genome.ucsc.edu, il a été possible de dessiner des amorces spécifiques dans le but d'amplifier par PCR 5kb de cette séquences. Les amorces 5'hVAN.A (20µM)(table I, p.52) et SalI/5'hVAN.1 (20µM)(table I, p.52) ont été utilisées pour faire une première amplification par l'enzyme Advantage 2® sur 1ml d'ADN génomique humain. Un deuxième PCR de type héli-intégré (heminested) à l'aide des amorces NotI/5'hVAN.B (20µM)(table I, p.52) et SalI/5'hVAN.1 (20µM)(table I, p.52) sur le premier produit de PCR a été nécessaire. La préparation et les conditions du PCR sont les mêmes que celles décrites à la section 2.3.1.

2.4.2 Isolation du fragment génomique 5' du gène *VNN1* humain

Une grosse bande de la taille d'environ 5kb a été identifiée dans le deuxième produit de PCR NotI/5'hVAN.B- SalI/5'hVAN.1. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T.

2.4.3 Préparation et ligation de l'insert génomique 5' du gène *VNN1* humain dans le vecteur d'expression pEGFP-1

Voir section 2.3.5. Dans ce cas-ci, l'insert a été coupé avec les enzymes NotI et SalI dans le tampon de digestion D 10X (Promega). Par contre, le vecteur pEGFP a été digéré avec les enzymes EcoRI et SalI, mais toujours dans le tampon D 10X. Lors de la ligation, il a fallu ajouter 1µl d'adapteur EcoRI/NotI (20µM) qui allait permettre de changer le site NotI de l'insert en un site EcoRI afin que la ligation dans pEGFP-1 puisse être effectuée.

2.5 CLONAGE DE 4kb DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE *Vanin-1* MURIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (construction 4kb mVANp-GFP).

2.5.1 Amplification de 4kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène *Vanin-1* murin

L'ADN génomique murin a été extrait à partir de rein de souris mâle adulte à l'aide de la trousse « Blood and Cell Culture DNA Maxi kit » de la compagnie QIAGEN (# Cat 13362). La concentration d'ADN de l'échantillon a été évaluée selon la méthode habituelle (voir section 2.1.2.2). Tout comme dans le cas des séquences promotrices du gène *VNN1* humain, il a été possible d'obtenir les séquences de souris sur le même site internet //genome.ucsc.edu. Les amorces 5'mVAN.D (20µM) (table I, p.52) et 5'mVAN.2 (20µM) (table I, p.52) ont été synthétisées pour faire un premier PCR, ainsi que les amorces NotI/5'mVAN.E (20µM)(table I, p.52) et SalI/5'mVAN.3(20µM)(table I, p.52) pour effectuer un deuxième PCR de type hémi-intégré. Voir la section 2.3.1 pour la préparation et les conditions de PCR.

2.5.2 Isolation du fragment génomique 5' de 4kb du gène *Vanin-1* murin

Une bande de la taille de 4kb a pu être détectée dans le deuxième produit de PCR NotI/5'mVAN.B- SalI/5'mVAN.1. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T.

2.5.3 Préparation et ligation de l'insert génomique 5' du gène *Vanin-1* murin dans le vecteur d'expression pEGFP-1

Voir section 2.4.5.

2.6 TRANSFECTIONS DES CELLULES CV-1

Les ADN plasmidiques utilisés pour les études de transfections ont été purifiés à l'aide de la trousse «EndoFree Plasmid Maxi kit » selon les instructions de la compagnie QIAGEN (# Cat. 12362). Les concentrations d'ADN plasmidique ont été évaluées à partir des mesures de D.O. Les fibroblastes de rein de singe vert (CV-1) ont été cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 2.5% NBS (Newborn bovine serum) (Gibco) et 1X d'antimycotiques (Gibco) à 37°C avec 5% CO₂. Les transfections transitoires ont été faites dans des plaques de culture de 24 puits à l'aide de la technologie «Effectene Transfection Reagent » commercialisé par QIAGEN (# Cat.301 427).

Le jour avant les transfections, 90 000 cellules CV-1 par puits ont été distribuées dans les plaques de cultures. Pour observer et comparer l'effet de différents facteurs de transcription sur la transactivation des séquences 5' flanquantes porcine, humaine et murine, chaque construction (10ng) (5kb pVANp-GFP, 5kb hVANp-GFP et 4kb mVANp-GFP) a été co-transfectée avec des concentrations croissantes (0, 1, 10, 50 et 100ng/puits) de différents plasmides contenant la séquence codante d'un facteur sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Les facteurs testés sont les suivants : SOX9 porcine (pSOX9cDNApBKCMV), Sox9 murin (mSOX9/pBKCMV) fourni par Richard Behringer, Lhx9 murin (Lhx9 ORF pcDNA3) fourni par Robert Viger, Sfl murin (CMVp mSflcDNA) fourni par Keith Parker, WT1 porcine (pWT1/pBKCMV), Gata4 murin (CMVp mGATA4 cDNA) gracieuseté de Robert Viger et SRY porcine (pSRY ORF-CMV). La quantité totale d'ADN a été gardée constante en utilisant le vecteur pBKCMV sans insert. Après 16 heures d'incubation, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais. Le deuxième matin suivant la transfection, les cellules ont été trypsinisées et resuspendues dans 500µl de PBS sans calcium afin de mesurer la fluorescence de la GFP. La

quantification de la fluorescence émise par la GFP a pu être possible en analysant le % de cellules fluorescentes et la moyenne de la fluorescence dans une population de 10 000 cellules à l'aide d'un appareil de FACS (Beckman Coulter) équipé d'un filtre GFP. Les expériences de transfections ont été répétées au moins 3 fois en duplicata.

2.7 CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE *PNI* PORCIN

2.7.1 Stratégie générale

Le clonage des séquences de l'ADNc du gène *PNI* porcin a été réalisé en utilisant la même stratégie que celle qui est expliquée à la section 2.1.1. Les séquences à partir de lesquelles les amorces ont été synthétisées sont les séquences humaines *PNI* (GenBank #M17783) et les séquences murines *Pn1* (GenBank #BCO10675).

2.7.2 Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène *PNI* porcin

2.7.2.1 Amplification du premier fragment d'ADNc du gène *PNI* porcin

Une RT a été réalisée à partir de l'ARN total de rein de porc (voir section 2.1.2.3.1) en utilisant l'amorce inversée NEX-1 (20µM) (table III, p.77). Un premier PCR a été effectué avec les amorces hétérologues NEX.A (20µM) et NEX.1(20µM)(table III, p.77) à une température d'appariement de 61⁰C. Un deuxième PCR intégré sur le produit du premier PCR a été fait avec les amorces NEX.B (20µM) et hNEX.2(20µM) (table III, p.77) à une température d'appariement de 62⁰C. Les autres conditions de PCR ont été les mêmes que celles décrites à la section 2.1.2.3.2 .

Table III. Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène *PN1* porcin. Le préfixe p indique que l'amorce a été créée à partir de la séquence porcine, une lettre après le point indique qu'il s'agit d'une amorce sens, alors qu'un chiffre après le point indique une amorce antisens. Dans certains cas, des sites de restrictions enzymatiques ont été rajoutés à la séquence des amorces.

pNEX.A

5' – CAGGACCAAGAAGCAGCTCACCA

pNEX.B

5' – GGCCATCGTCTCCAAGAAGAATA

pNEX.C

5' – CCTTCATGTTTCTCACATCTTGCA

pNEX.D

5' – CGAAAGCTTCCGCAGCAACAAC

hNEX.F

5' – GTCCTTGGTGGAAGGAACCATGA

pNEX.1

5' – CAGCACCTGTAGGATTATGTCTG

pNEX.2

5' – GGTCTGTCTACTATAAACCAGGG

pNEX.3

5' – GGACACTGTCGAGAAGATCTGGG

pNEX.4

5' – CCTCGTGACGAAAGGCACTTCCA

pNEX.7

5' – GGAGCCGAGTTCCTCCAGCGACAGAG

pNEX.8

5' – GCAGCGTCACGGTGGCCACGAGGAAG

p5' NEX.1

5' – CACTTGCTGGGTCCCAATTCTGTGCCAGA

p5' NEX.2

5' – CCCATGGCATATGGAGGTTTCCAAGCTAG

p5'NEX.3

5' – CCAAGACCCTTGCCCTCT

p5'NEX.4

5' – GCTGCACCACAATGGGAAC

p5'NEX.5

5' – GAAACGAATCCCTTGAGG

p5'NEX.B

5' – GGGAGACAGTCTTCGCTG

p5' NEX.C

5' – GCTCAAGCCCTTTCATGA

p5'NEX.D

5' – GACAGGCTGCATTTACAC

p5'NEX.E

5' – CCATATGCCTTGGGTGTG

p5'NEX.F

5' – GCGAAAGAACATAGGGATCACACCCACTC

XhoI/p5'NEX.G5' – CTCGAGGGGCTACTGAACTTTGGCGAGAAGTAAAAGC**Sall/p5'NEX.6**5' – GTCGACGGTTCCTTCCACCAAGGACAACCTGAGAAA

2.7.2.2 Isolation des fragments d'ADNc du gène *PN1* porcin

Une grosse bande de la taille d'environ 800pb a été détectée dans la réaction de PCR intégrée NEX.B2. Le produit de PCR NEX.B2 a été ligué directement dans pGEM®-T et séquencé.

2.7.3 Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène *PN1* porcin

2.7.3.1 Amplification de l'extrémité 3' du gène *PN1* porcin

Une RT à partir de l'ARN total de rein de porc (voir section 2.1.2.3.1.) a été effectuée à l'aide de l'amorce renversée ADT7T17 (voir section 2.1.3.1). Un premier PCR a été fait sur la RT à l'aide des amorces pNEX.C (table III, p.77) et ADB,H,E (table II, p.59) et un deuxième PCR a été fait à partir du premier produit PCR en présence des amorces pNEX.D (table III p.77) et ADET7 (table II, p.59). Lors des deux réactions de PCR, la température d'appariement des amorces a été de 64°C et le temps d'élongation a été de 2 minutes. Les autres conditions ont été décrites à la section 2.1.2.3.2.

2.7.3.2 Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène *PN1* porcin

Une bande de la taille d'environ 900pb a été visualisée pour la deuxième réaction de PCR NEX.D-ADET7. Le produit de PCR a été ligué directement dans pGEM®-T et séquencé.

2.7.4 Clonage d'un bout 5' contenant l'ATG de l'ADNc du gène *PN1* porcin

2.7.4.1 Amplification d'un bout 5' du gène *PN1* porcin

À partir de 1µl d'ADN génomique de porc, des réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'une amorce hétérologue déduite de la séquence *PN-1* humaine (GenBank #M17783) et d'amorces spécifiques antisens complémentaires à la région 5' du premier fragment d'ADNc cloné. Pour le premier PCR, les amorces hNEX.F et pNEX.3 (table III, p.77) ont été utilisées tandis que les amorces hNEX.F et pNEX.4 (table III, p.81) ont été utilisées pour le deuxième PCR de type intégré. L'appariement des amorces a été de 64°C dans le cas du premier PCR et de 66°C dans le cas du deuxième PCR. Les autres conditions de PCR ont été celles décrites à la section 2.1.2.3.2.

2.7.4.2 Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène *PN1* porcin

Une bande intéressante d'environ 600pb a été détectée dans le premier produit de PCR NEX.F3 et une bande d'environ 500pb pour le produit de PCR NEX.F4. 1µl du premier produit de PCR NEX.F3 a été ligué directement dans le vecteur pGEM®-T et séquencé.

2.8 CLONAGE DES SÉQUENCES 5'FLANQUANTES DU GÈNE *PN1* PORCIN

2.8.1 Stratégie générale

À l'aide des mini-librairies d'ADN génomique porcin non-clonées déjà construites (voir sections 2.2.3.1), deux séries d'amplification par PCR utilisant des amorces antisens spécifiques au gène *PN1* ont été faites dans le but d'obtenir les séquences 5' flanquantes du gène *PN1* porcin.

2.8.2 Clonage d'un premier fragment d'ADN génomique 5' de 500p en amont de l'ATG du gène *PN1* porcin

2.8.2.1 Amplification des fragments génomiques 5' du gène *PN1* porcin

Lors de la première réaction de PCR, 1 µl de chaque mini-librairie a été mis en présence de 1µl d'amorces sens AP1 (10µM) (fournies par la trousse « Universal GenomeWalker » (Clontech)) et 0,5µl d'amorces antisens spécifiques pNEX.7 (20µM) (table III, p.81). Pour la deuxième réaction de PCR de type intégrée, 1µl d'une dilution 1/50 du premier produit de PCR a été mis en présence de 1µl d'amorces sens AP2 (10µM) (fournies par la trousse « Universal GenomeWalker » (Clontech)) et 0,5µl d'amorces antisens spécifiques pNEX.8 (table III, p.77). Les autres conditions pour le premier et le deuxième PCR ont été exactement identiques à celles décrites à la section 2.2.3.2.

2.8.2.2 Isolation des fragments génomiques 5' du gène *PN1* porcin

Pour la mini-librairie digérée PvuII, une bande de la taille d'environ 500pb a été détectée et extraite à partir du gel d'agarose à l'aide de la trousse « QIAquick Gel Extraction kit » de la compagnie QIAGEN (#Cat. 28704). Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée.

2.8.3 Clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique 5' de 3kb en amont du premier fragment génomique 5' du gène *PN1* porcin

2.8.3.1 Amplification des fragments génomiques 5' du gène *PN1* porcin

Suite au séquençage du premier fragment génomique 5' de 500pb, des amorces antisens spécifiques à la région 5' de ce fragment ont été synthétisées afin d'obtenir plus de séquences promotrices toujours à partir des 4 mini-librairies porcines (voir section 2.2.3.1). Un premier PCR a été fait avec les amorces AP1 et p5'NEX.1 (table III, p.77) et un deuxième PCR de type emboîté a été fait avec les amorces AP2 et p5'NEX.2 (table III, p.77). Voir section 2.2.3.2. pour plus de détails.

2.8.3.2 Isolation des fragments génomiques 5' du gène *PN1* porcin

Une bande d'une taille d'environ 3kb a été détectée dans la mini-librairie digérée par EcoRV. Le fragment a été extrait à partir du gel d'agarose à l'aide de la trousse «QIAquick Gel Extraction kit » de la compagnie QIAGEN (#Cat. 28704). Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée. En plus des amorces Sp6 et T7 (table II, p.59) qui reconnaissent le vecteur pGEM®-T, des amorces spécifiques internes ont été synthétisées pour obtenir la séquence complète du fragment de 3kb : p5'NEX.3, p5'NEX.4, p5'NEX.5, p5'NEX.B, p5'NEX.C, p5'NEX.D, p5'NEX.E (table III, p.81).

2.9 CLONAGE DE 3,5kb DE SÉQUENCES PROMOTRICES DU GÈNE *PN1* PORCIN DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEGFP-1 (construction 3,5kb pPN1p-GFP).

2.9.1 Amplification de 3,5kb de séquence de promoteur en amont de l'ATG du gène *PN1* porcin

Le fragment de 3,5kb a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de porc selon les conditions décrites à la section 2.3.1. Dans ce cas-ci, les amorces de la première réaction de PCR ont été pNEX.8 et p5'NEX.F (table III, p.77) et les amorces de la deuxième PCR ont été XhoI/pNEX.G et Sall/p5'NEX.6 (table III, p.77). Le temps d'appariement/élongation a été de 4 minutes (1minute/kb).

2.9.2 Isolation du fragment génomique 5' de 3,5kb du gène *PN1* porcin

Une bande de taille prévue de 3,5kb a été détectée pour le deuxième produit de PCR XhoI/pNEX.G -Sall/p5'NEX.6. Le fragment a été extrait à partir du gel d'agarose à l'aide de la trousse «QIAquick Gel Extraction kit » de la compagnie QIAGEN (#Cat. 28704). Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T.

2.9.3 Préparation et ligation de l'insert génomique 5' de 3,5kb du gène *PNI* porcin dans le vecteur d'expression pEGFP-1

Voir section 2.3.5. Dans ce cas-ci, l'insert a été coupé avec les enzymes XhoI et SalI dans le tampon de digestion D 10X (Promega). Par contre, le vecteur pEGFP-1 a été digéré avec les enzymes XhoI et EcoRI, dans le tampon High 10X (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100µg/ml BSA, 100mM NaCl). Lors de la ligation, il a fallu ajouter 1µl d'adapteur EcoRI/SalI (20µM) qui allait permettre de changer le site SalI de l'insert en un site EcoRI afin que la ligation dans pEGFP-1 puisse être effectuée.

2.10 TRANSFECTIONS DES CELLULES CV-1

Voir section 2.6. Le jour avant les transfections, 90 000 cellules CV-1 par puits ont été distribuées dans les plaques de cultures. Pour observer l'effet de différents facteurs de transcription sur l'expression du gène *PNI*, 50ng de la construction 3,5kb pPNIp-GFP a été co-transfecté avec des concentrations croissantes (0, 1, 10, 50 et 100ng/puits) de différents plasmides contenant la séquence codante d'un facteur sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Les facteurs testés ont été les suivants : SOX9 porcin (pSOX9cDNApBKCMV), Lhx9 murin (Lhx9 ORF pcDNA3) fourni par Robert Viger, Sfl murin (CMVp mSflcDNA) fourni par Keith Parker, WT1 porcin (pWT1/pBKCMV), Gata4 murin (CMVp mGATA4 cDNA) gracieuseté de Robert Viger et SRY porcin (pSRY ORF-CMV). La quantité totale d'ADN a été gardée constante en utilisant le vecteur pBKCMV sans insert. Après 16 heures d'incubation, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais. Le deuxième matin suivant la transfection, les cellules ont été trypsinisées et resuspendues dans 500µl de PBS sans calcium afin de mesurer la fluorescence de la GFP. La quantification de la fluorescence émise par la GFP a pu être possible en analysant le % de cellules fluorescentes et la moyenne de la fluorescence dans une population de 10 000 cellules à l'aide d'un appareil de FACS (Beckman Coulter) équipé d'un filtre GFP. Les expériences de transfections ont été répétées au moins 3 fois en duplicata.

2.11 CLONAGE DES SÉQUENCES DE L'ADNc DU GÈNE *FGF9* PORCIN.

2.11.1 Stratégie générale

Voir section 2.1.1. Les amorces ont été synthétisées à partir des séquences humaine (GenBank #XM_007105) et murine (GenBank #NM_013518) du gène *Fgf9/FGF9*.

2.11.2 Clonage d'un premier fragment de l'ADNc du gène *FGF9* porcin

2.11.2.1 Amplification d'un premier fragment d'ADNc du gène *FGF9* porcin

Un premier brin d'ADNc a été synthétisé par RT à partir de 1µg d'ARN poly(A)+ de rein de porc en utilisant 1µl d'amorce hétérologue renversée FGF9.1 (20µM) (table IV, p.86). Le premier brin d'ADNc a ensuite été amplifié par deux séries de réaction de PCR, la première a utilisé les amorces FGF9.A (20µM) et FGF9.2 (20µM) (table IV, p.86) à une température d'appariement de 65°C et la deuxième de type intégré, les amorces FGF9.B et FGF9.3 (20µM) (table IV, p.86) à une température d'appariement de 63°C. Les autres conditions de PCR ont été décrites à la section 2.1.2.3.2.

2.11.2.2 Isolation du premier fragment amplifié du gène *FGF9* porcin

Une simple bande de la taille d'environ 600pb a été détectée dans le deuxième produit de PCR FGF9.B3. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée.

Table IV. Séquence des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène *FGF9* porcin. Le préfixe p indique que l'amorce a été créée à partir de la séquence porcine, une lettre après le point indique qu'il s'agit d'une amorce sens, alors qu'un chiffre après le point indique une amorce antisens. Dans certains cas, des sites de restrictions enzymatiques ont été rajoutés à la séquence des amorces.

FGF9.A

5' – CATTTAATGGATTGAAGAAAAGAACC

FGF9.B

5' – GGGAGTTGGATATACCTCGCCTA

FGF9.1

5' – TTTTAAGGGCTCAAGTGAAGA

FGF9.2

5' – TCAACTTTGGCTTAGAATATCCTTATA

FGF9.3

5' – GGGTCCACTGGTCTAGGTAAAA

pFGF9.C

5' – GGCGTTAAACAAGGACGGGAC

pFGF9.D

5' – CGAGGACTAAACGGCACCAGAA

hFGF9.G

5' – GAAACAGCAGATTACTTTTATTT

pFGF9.8

5' – GGTTCCCTGGATAGTACCA

2.11.3 Clonage de l'extrémité 3' non- transcrite de l'ADNc du gène *FGF9* porcin

2.11.3.1 Amplification de l'extrémité 3' du gène *FGF9* porcin

Une RT à l'aide de l'amorce renversée ADT7T17 (table II, p.59) a été fait à partir de 1 µg d'ARN poly(A)+ de porc. L'amorce sens spécifique pFGF9.C (table IV, p.86) et l'amorce antisens ADB,H,E (table II, p.59) ont été utilisées pour la première amplification du fragment 3' et les amorces pFGF9.D (table IV, p.86) et ADET7 (table II, p.59) pour la deuxième amplification de type intégré. Dans les deux cas, la température d'appariement des amorces a été de 62°C et le temps d'élongation a été de 90 secondes.

2.11.3.2 Isolation des fragments d'ADNc du bout 3' du gène *FGF9* porcin

Une seule bande de la taille d'environ 250pb a été observée pour le deuxième produit de PCR pFGF9.D-ADET7. Cette bande a été extraite du gel grâce à la trousse « QIAquick Gel Extraction kit » commercialisée par QIAGEN. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée.

2.11.4 Clonage d'un bout 5' contenant l'ATG de l'ADNc du gène *FGF9* porcin

2.11.4.1 Amplification d'un bout 5' du gène *FGF9* porcin

À partir de 1 µl d'ADN génomique de porc, une seule réaction de PCR a été réalisée à l'aide d'une amorce hétérologue hFGF9.G (table IV, p.86) déduite de la séquence FGF9 humaine (GenBank #XM_007105) et d'une amorce spécifique antisens pFGF9.8 (table IV, p.86) complémentaires à la région 5' du premier fragment d'ADNc cloné. L'enzyme Taq polymérase du mélange Expand High Fidelity® (Roche Molecular Biochemicals) a effectué la réaction dans les conditions décrites à la section 2.1.2.3.2. La température d'appariement des amorces a été de 52°C.

2.11.4.2 Isolation des fragments d'ADNc du bout 5' du gène *FGF9* porcin

Une bande d'environ 400pb a été détectée dans le produit de PCR FGF9.G8. Cette bande a été liguée dans le vecteur pGEM®-T et séquencée.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

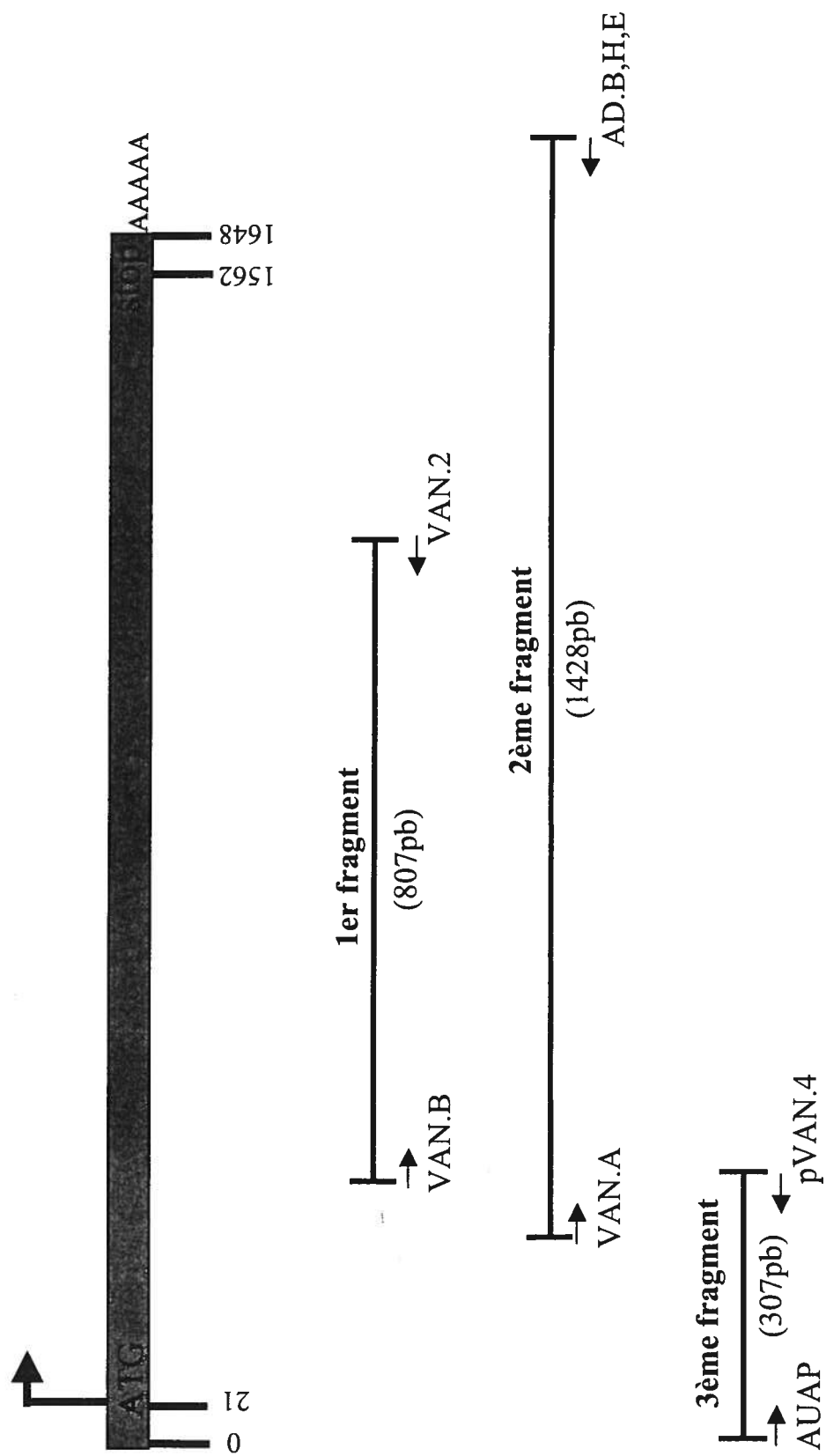
3 RÉSULTATS

3.1 GÈNE *VNN1* PORCIN

3.1.1 Amplification de la séquence de l'ADNc du gène *VNN1* porcin

La démarche utilisée pour le clonage de la séquence de l'ADNc du gène *VNN1* porcin est illustrée à la figure 2. L'amplification complète de l'ADNc du gène *VNN1* porcin a pu être réalisée à l'aide d'amorces déduites des séquences humaine et murine du gène *VNN1* disponibles dans les banques de données (GenBank #NM_004666 et #NM_011704) et d'amorces spécifiques porcines (table I, p.52). À partir de l'ARN total de rein de porc mâle, une première RT à l'aide de l'amorce hétérologue renversée VAN.1 a été exécutée. Les amorces hétérologues VAN.A et VAN.1 ont été utilisées pour une première amplification par PCR et les amorces hétérologues VAN.B et VAN.2 ont été utilisées pour une deuxième amplification par PCR de type emboîtée. Cette deuxième réaction de PCR a produit un fragment interne de 807 pb. Pour obtenir la séquence de l'extrémité 3' de l'ADNc du gène *VNN1* porcin, l'amorce ADT7T17 qui reconnaît la queue poly(A)+ de l'ARNm a été utilisée pour faire la RT. Les amorces VAN.A et AD.B,H,E ont été utilisées dans le cadre d'un premier PCR et elles ont permis d'obtenir un fragment de 1428 pb. À partir de la séquence du fragment interne d'ADNc, des amorces spécifiques ont été synthétisées afin de pouvoir amplifier l'extrémité 5' de l'ADNc du gène *VNN1*. À l'aide de la trousse « 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends » commercialisée par Gibco BRL, un fragment de 307pb a pu être amplifié suite à une deuxième réaction de PCR en présence de l'amorce spécifique porcine pVAN.4 et de l'amorce commerciale AUAP fournie par la trousse du 5' RACE. Le séquençage de ces trois fragments a permis d'obtenir la séquence complète de l'ADNc du gène *VNN1* porcin.

Figure 2. Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène *VNN1* porcin.



3.1.2 Séquence de l'ADNc du gène *VNNI* porcin

La séquence complète de l'ADNc du gène *VNNI* porcin ainsi que la localisation et la direction des différentes amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage sont représentées à la figure 3. Cette séquence de 1668pb a aussi été soumise à la banque de données internet GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sous le numéro d'accès AF350911. Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 21 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 1562. À partir de cette séquence, il a été possible de déduire la séquence en acides aminés de la protéine VANIN-1 porcine codée par le gène *VNNI* porcin. Cette séquence est représentée à la figure 4.

3.1.3 Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène *VNNI* chez les autres espèces

La séquence codante du gène *VNNI* porcin a été soumise à une comparaison avec l'ensemble des séquences disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). La figure 5 fait état des séquences des gènes qui ont un fort pourcentage de similarité avec la séquence codante porcine. Outre les séquences humaine et murine du gène *VNNI*, on retrouve les séquences humaine et canine du gène *TIFF66* dans la liste des gènes qui possèdent une bonne similarité avec la séquence porcine. La table V indique les pourcentages de similarité qui existe entre les séquences codantes de certains gènes répertoriés dans cette liste. La séquence porcine du gène *VNNI* possède 84% d'homologie avec la séquence humaine, 76,6% avec la séquence murine et 84,1% avec la séquence canine du gène *TIFF66*. Par rapport à la séquence codante humaine du gène *VNNI*, la séquence porcine est plus similaire (84%) que la séquence murine (78,5%), mais un peu moins que la séquence du gène *TIFF66* canin (84,8%).

3.1.4 Comparaison entre les séquences en acides aminés de la protéine VANIN-1 chez le porc, l'humain, la souris et le chien.

Figure 3. Séquence complète de la séquence codante du gène *VNN1* porcin. Les amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène sont soulignées. Une flèche orientée → indique que c'est une amorce sens, alors qu'une flèche orientée ← indique que c'est une amorce antisens. Les deux premiers encadrés identifient le début et l'arrêt de la transcription de ce gène. Le dernier encadré met en évidence la queue poly(A+) du transcrit.

DÉBUT AgeI/K/VAN.F →

```

5'- AGCAGCTGTT GGACTTCAGC ATGATCACAT CTCGTTGCT GGCTTATGTG GCGATTCTGT
3'- TCGTCGACAA CCTGAAGTCG TACTAGTGTA GAGGCAACGA CCGAATACAC CGCTAAGACA

      70      80      90      100      110      120
TTTTCTGTGT CTTAAAGGCC AGCTCCCTGG ATACCTTTAT CGCCGCTGTT TATGAACATG
AAAGAGACACA GAATTTTCGG TCGAGGGACC TATGGAAATA GCGGCACAA ATACTTGTAC

      130      140      150      160      170      180
CAGCGATATT GCCTGATGCC CCCCTCACAC CAGTATCCCA TGAAGAGGCT TTGATGTTAA
GTCGCTATAA CCGACTACGG GGGGAGTGTG GTCATAGGGT ACTTCTCCGA AACTACAAAT

      190      200      210      220      230      240
TGAACCGCAA TCTGGATCTT TTGGAGGGCG CAGTCACGTC AGCAGCAAG CAGGGTGCAC
ACTTGGCGTT AGACCTAGAA AACCTCCCGC GTCAGTGCAG TCGTCGTTTC GTCCACGTC

      250      260      270      280      290      300
ATATTATTGT GACTCCAGAA GATGGTGTTC ACGGCTTTTT CTTAGCAGG GAATCTATTT
TATAATAACA CTGAGGTCTT CTACCACAA TGCCGAAAA GAAGTCGTCC CTTAGATAAA

      310      320      330      340      350      360
ACTCATACTT AGAGGACATC CCAGACCCTC ACGTGAAGTG GATCCCTTGT ACCAATCCCA
TGAGTATGAA TCTCCTGTAG GGTCTGGGAG TGCACTTGAC CTAGGGAAAC TGGTTAGGGT

      370      380      390      400      410      420
GCAGATTTGG CCACACTCCA GTACAAAAA GACTCAGCTG CCTGGCCAGG GACAACTCCA
CGTCTAAACC GGTGTGAGGT CATGTTTTTT CTGAGTCGAC GGACCGGTCC CTGTTGAGGT

      430      440      450      460      470      480
TCTACATTGT GGCAATATT GGGGACAGA AGCCATGCAA TGCCAGTGAC CCCGATTGTC
AGATGTAAAC CCGTTTATTA CCCCTGTTCT TCGGTACGTT ACGGTCACTG GGGCTAACAG

      490      500      510      520      530      540
CCCATGACGG CCGTTACCAG TACACACTG ATGTGGTGTG TGATTCTGAG GGCAGACTGG
GGGTACTGCC GGCATGGGTC ATGTTGTGAC TACACCACAA ACTAAGACTC CCGTCTGACC

      550      560      570      580      590      600
TGGCAGGCTA TCATAGCAA AATCTTTTCT TGGGTGAAGA TCAATTGCGT GCACCCAAGG
ACCGTGCGAT AGTATTCGTT TTAGAAAAGA ACCCACTTCT AGTTAAGCTA CGTGGGTTCC

      610      620      630      640      650      660
AACCCGAGAT CGTGACTTTC GACACCACCT TTGGAGATT TGGCATTTTC ACGTGCTTTG
TTGGGCTCTA GCACTGAAG CTGTGGTGGG AACCTTCTAA ACCGTAAAG TGCACGAAC

      670      680      690      700      710      720
GTATTCTCTT CCATGATCCC GCTGTGACTC TGGTGAAAGA TTTCCAGGTG GACACCATAC
CATAGAGAA GGTACTAGGG CGACACTGAG ACCACTTTCT AAGGTCCAC CTGTGGTATG

      730      740      750      760      770      780
TCTTCCCGAC AGCTTGGATG AATGTTTTGC CACATTTGAC AGCTATTGAA TTCCACTCAG
AGAAGGGCTG TCGAACCTAC TTACAAAACG GTGTAACTG TCGATACTT AAGGTGAGTC

      790      800      810      820      830      840
CTTGGGCTAT GGGCATGAGA GTCACTTCC TTGCAGCCAA TATACATTTT CCCTTAAGAA
GARCCCGATA CCCGTACTCT CAGTTGARAG AACGTCGGTT ATATGTAAAG GGGATTCTT

      850      860      870      880      890      900
AARTGACAGG AAGTGGCATC TATGCACCTG ATTCTCCAAG AGCATTTTCA TATGATATGA
TTTACTGTCC TTCACCGTAG ATACGTGGAC TAAGAGGTTT TCGTAAGTA ATACTATACT

```

VAN.A → ← pVAN.8

← pVAN.10 ← pVAN.9

← pVAN.9

← pVAN.5

← pVAN.4

← pVAN.3

VAN.B →

```

      910      920      930      940      950      960
AGACAAAGGA GGGAAACTC CTCCTCTCAC AATTGGACTC CCACCCACAC CGCCCAGCAG
TCTGTTTCCT CCCTTTTGAG GAGGAGAGTG TTAACCTGAG GGTGGGTGTG GCGGGTCGTC

      970      980      990      1000     1010     1020
TGAATTGGAC TTCTTATGCC AGTGGTTTAC CAACCCCTT AGTGGGAAC CAGGAATTTA
ACTTAACCTG AAGAATACGG TCACCAATG GTTGGGGGAA TCACCTTTG GTCCTTAAT

      1030     1040     1050     1060     1070     1080
AAGCACTGT CTTTTTTGAC GAGTTCACCT TCTTGGAGCT CAAAGGAGTT GCAGGAATT
TTTCGTGACA GAAAAAAGTG CTCAGTGGA AGAACCTCGA GTTTCCTCAA CGTCCTTTAA

      1090     1100     1110     1120     1130     1140
ACACAGTTTG TCAGAAAGAT CTCTGCTGTC AGCTAAGTTA CAGGATGCTT GAGAAGAGAG
TGTGTCGAAC AGTCTTTCTA GAGACGACAG TCGATTCAAT GTCCTACGAA CTCTTCTCTC

      1150     1160     1170     1180     1190     1200
AAGACGAGGT TTATGCACTA GGGGCATTCC ATGGACTACA TACTGTGGAA GGGAGCTATT
TTCTGCTTCA AATACGTGAT CCCCGTAGC TACCTGATGT ATGACACCTT CCCTCGATAA

      1210     1220     1230     1240     1250     1260
ATTTACAGAT TTGTACTTTG TTGAAGTGTA AAACAATGGA CTTACACTCC TGTGGTGACT
TAATGTCTA AACATGAAC AACTTCACAT TTTGTTACCT GAATGTGAGG ACACCACTGA

      1270     1280     1290     1300     1310     1320
CGGTGGAAAC TGCTTCCACC AGGTTTGAA TGTTCCTCCT CAGTGGCACT TTTGGACCC
GCCACCTTG ACGAAGGTGG TCCAACTTT ACAAGAGGGA GTCACCGTGA AACCTTGGG

      1330     1340     1350     1360     1370     1380
AGTATGTGTT CCCTGAGGTG TTGCTGAGTG ACATACAGCT TGCACCTGGA GAATTTCAGG
TCATACACAA GGGACTCCAC AACGACTCAC TGTATGTCGA ACGTGGACCT CTTAAGTCC

      1390     1400     1410     1420     1430     1440
TGTCAAGTGA TGGACGCTTG TTCAGCCTGA AGCCACCGTC TGGACCTGTC TTGACTGTCA
ACAGTTCACT ACCTGCGAAC AAGTCGGACT TCGGTGGCAG ACCTGGACAG AACTGACAGT

      1450     1460     1470     1480     1490     1500
CTCTGTTTGG GAGGTTATAT GAGAGGGATA GTGCATCAGG TGCTTCAGCA GACCTCGTGG
GAGACAACC CTCCAATATA CTCTCCCTAT CACGTAGTCC ACGAAGTCGT CTGGAGCACC

      1510     1520     1530     1540     1550     1560
CACAGGACT GAGAGTCATG CTCGGAGTTA TAATACTAT TATGTACTCA TTAAGTTGGT
GTGTTCTCGA CTCTCAGTAC GAGCCTCAAT ATTATTGATA ATACATGAGT AATTCACCA
ARRÊT 1570     1580     1590     1600     1610     1620
AGATATTTA TACTTTTGTG TCTTTCACCT TGGATCCTTT AAAAAATGAT GGATATGAAA
TCTTATAAT ATGAACACAG AGAAGTGAA ACCTAGGAAA TTTTCTACTA CCTATACTTT

      1630     1640     1650     1660     1670     1680
AGAAGAAGGG GTCTGGGATC TTGATCATTA AAAAAAAAAA AAAAAAAA].. ..... - 3'
TCTTCTCCC CAGACCTAG AACTAGTAT TTTTTTTTTT TTTTTTTT].. ..... - 5'

```

queue poly(A)+

Figure 4. Séquence en acides aminés de la protéine VANIN-1 porcine déduite de la séquence codante du gène *VNN1* porcin.

10	20	30	40	50	60
MITSPLLAYV	AILFFCVLKA	SSLDTFIAAV	YEHAAILPDA	PLTPVSHEEA	LMLMNRNLDL
70	80	90	100	110	120
LEGAVTSAAK	QGAHIIVTPE	DGVYGFFFSR	ESIYSYLEDI	PDPHYNWIPC	TNPSRFGHTP
130	140	150	160	170	180
VQKRLSCLAR	DNSIYIVANI	GDKKPCNASD	PDCPHDGRYQ	YNTDVVFDSE	GRLVARYHKQ
190	200	210	220	230	240
NLFLGEDQFD	APKEPEIVTF	DTTFGRFGIF	TCFGILFHDP	AVTLVKDFQV	DTILFPTAWM
250	260	270	280	290	300
NVLPHLTAIE	FHSAWANGMR	VNFLAANIHF	PLAKMTGSGI	YAPDSPRAFH	YDMKTKEGKL
310	320	330	340	350	360
LLSQLDSEPH	RPAVNWTSYA	SGLPTPLVGN	QEFKSTVFFD	EFTFLELKGV	AGNYTVCCQD
370	380	390	400	410	420
LCCQLSYRML	EKREDEVYAL	GAFDGLHTVE	GSYYLQICTL	LKCKTMDLHS	CGDSVETAST
430	440	450	460	470	480
RFEMFSLSGT	FGTQYVFPEV	LLSDIQLAPG	EFQVSSDGRL	FSLKPPSGPV	LTVTLFGRLY
490	500	510	520	530	540
ERDSASGASA	DLVAQGLAYM	LGVIITIMYS	LSW*

Figure 5. Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène *VNN1* porcin (**Sus scrofa vanin-1 mRNA...**) suite à une recherche effectuée dans le moteur de recherche BLAST offert par le site internet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gi 13655617 gb AF350911.2 AF350911 Sus scrofa vanin-1 mRNA ,...	3057	0.0
gi 6649539 gb U39663.1 CFU39663 Canis familiaris TIFF66 mRN...	850	0.0
gi 4759311 ref NM_004666.1 Homo sapiens vanin 1 (VNN1), mRNA	813	0.0
gi 4128046 emb AJ132099.1 HSA132099 Homo sapiens mRNA for V...	813	0.0
gi 6649541 gb U39664.1 HSU39664 Homo sapiens Tiff66 mRNA, c...	813	0.0
gi 16798417 gb AF430245.1 AF430245 Sus scrofa vanin-1 gene,...	424	e-115
gi 4572584 emb AL032821.2 HS55C23 Human DNA sequence from c...	331	2e-87
gi 17512498 gb BC019203.1 Mus musculus, vanin 1, clone MGC...	299	7e-78
gi 6755978 ref NM_011704.1 Mus musculus vanin 1 (Vnn1), mRNA	299	7e-78
gi 4138228 emb AJ132098.1 MMU132098 Mus musculus mRNA for V...	299	7e-78

Table V. Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène *VNN1* chez différentes espèces de mammifères. Les séquences homologues ont été comparées à partir du codon du début de la transcription (ATG) jusqu'au codon de terminaison.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa <i>VNNI</i> (AF350911)	Homo sapiens <i>VNNI</i> (NM_004666)	Mus musculus <i>Vnn1</i> (NM_011704)	Canis familiaris <i>TIFF66</i> (U39663)
Sus scrofa <i>VNNI</i> (AF350911)	100%			
Homo sapiens <i>VNNI</i> (NM_004666)	84%	100%		
Mus musculus <i>VNNI</i> (NM_011704)	76.6%	78.5%	100%	
Canis familiaris <i>TIFF66</i> (U39663)	84.1%	84.8%	76.4%	100%

La table VI démontre le pourcentage de similarité qui existe entre les séquences en acides aminés des protéines codées par les gènes qui possèdent une bonne homologie avec le gène *VNN1* porcin chez différentes espèces. Les séquences en acides aminées sont déduites des séquences codantes disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). La séquence en acides aminés de la protéine VANIN-1 semble bien conservée entre les espèces. La séquence porcine est semblable à la séquence humaine à 79,3% et à la séquence murine à 76,2%. La protéine VANIN-1 porcine possède 78,6% d'homologie avec la protéine TIFF66 chez le chien domestique. Encore cette fois, par rapport à la séquence en acides aminés humaine, la séquence porcine est plus similaire (79,3%) que la séquence murine (77,3%) et un peu moins que la séquence canine de la protéine TIFF66 (79,7%).

3.1.5 Stratégies de clonage des séquences génomiques 5' du gène *VNN1* porcin

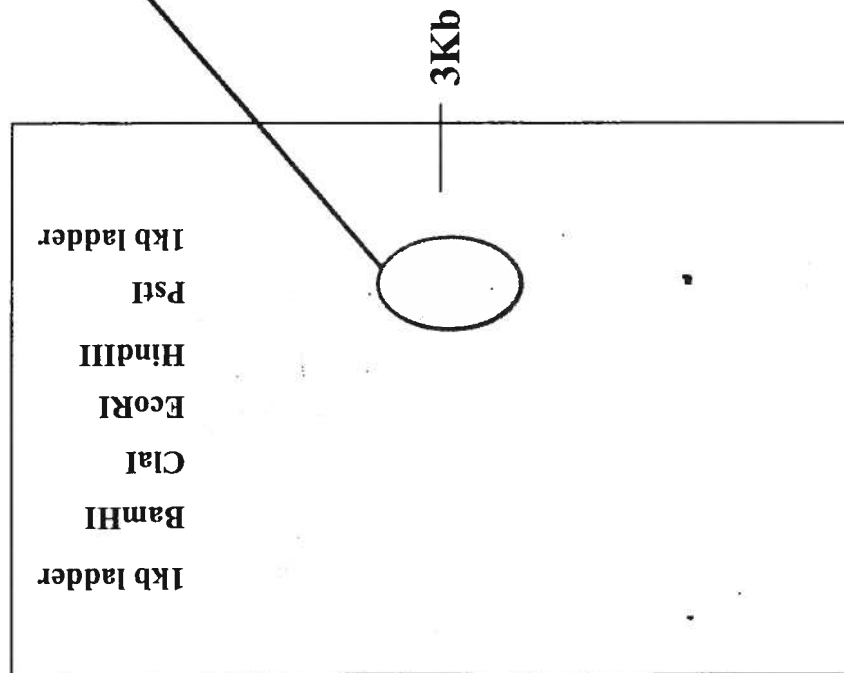
Une double stratégie a été utilisée pour obtenir 5kb de séquence de la région promotrice du gène *VNN1* porcin. La figure 6 illustre la première stratégie qui a permis le clonage d'un premier fragment génomique de 1,9kb en amont du codon d'initiation de la transcription du gène *VNN1* porcin. Suite à une analyse Southern blot sur l'ADN génomique de porc, une sonde complémentaire à une portion de l'exon1 du gène *VNN1* a reconnu un fragment digéré par l'enzyme PstI d'environ 3kb. À partir de cette indication, une mini-génothèque de fragments génomiques de tailles sélectionnées (2-4kb) digérés par PstI a été construite. Un criblage de cette mini-génothèque par PCR a produit un fragment de 1,9kb avec les amorces β GAL.2 (table II, p.59) et pVAN.10 (table I, p.52). La figure 7 illustre la deuxième stratégie qui a permis le clonage d'un deuxième fragment de 3,3kb en amont du premier fragment de 1,9kb. Quatre mini-librairies d'ADN génomique porcin non-clonées ont été produites à l'aide de la technologie «Universal Genome Walker » (Clontech). Le criblage par PCR de ces 4 mini-librairies a permis d'amplifier un fragment de 3,3kb avec les amorces AP2 (Clontech) et p5'VAN.4 (table I, p.52). La somme des deux séquences des deux fragments clonés donne une séquence totale de 5kb pour la région promotrice du gène *VNN1* porcin.

Table VI. Pourcentages de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine VANIN-1 qui découlent de la séquence codante du gène *VNN1* chez différentes espèces de mammifère.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa VANIN-1 (AF350911)	Homo sapiens VANIN-1 (NM_004666)	Mus musculus Vanin-1 (NM_011704)	Canis familiaris TIFF66 (U39663)
Sus scrofa VANIN-1 (AF350911)	100%			
Homo sapiens VANIN-1 (NM_004666)	79.3%	100%		
Mus musculus Vanin-1 (NM_011704)	76.2%	77.3%	100%	
Canis familiaris TIFF66 (U39663)	78.6%	79.7%	74.3%	100%

Figure 6. Illustration de la première stratégie utilisée pour le clonage du premier fragment d'ADN génomique (1,9kb) de séquences 5' flanquantes du gène *VNN1* porcin.

1) Southern Blot *



*Sonde complémentaire
à une portion de l'exon 1
du gène *VNN1*

2) Création d'une mini-génothèque

- Digestion industrielle d'ADN génomique avec enzyme PstI
- Excision des bandes allant de 2-4kb
- Ligation des bandes dans un plasmide pBS (Stratagene) préalablement coupé avec PstI

3) PCR ancré

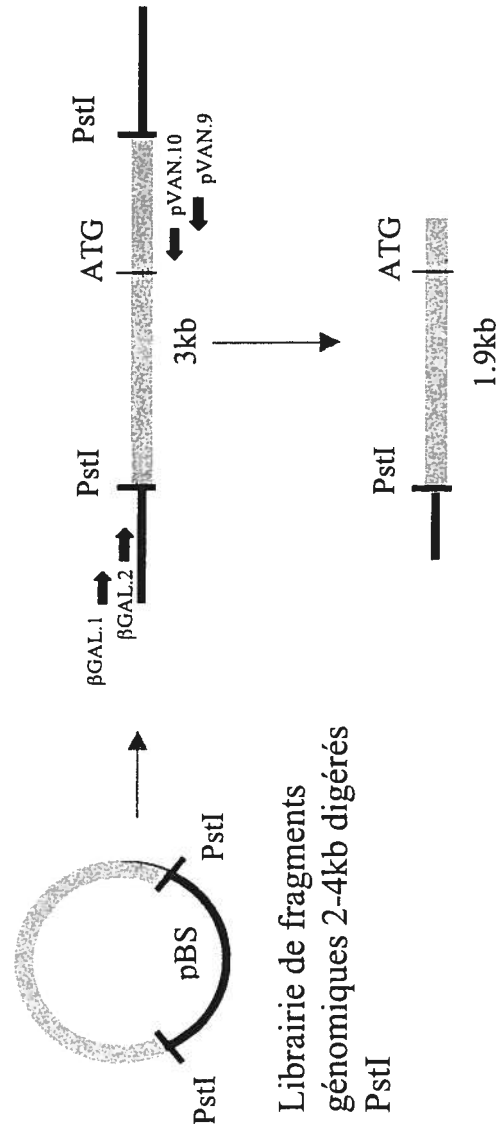


Figure 7. Illustration de la stratégie qui a permis le clonage d'un deuxième fragment d'ADN génomique (3,3kb) de séquences 5'flanquantes en amont du premier fragment génomique de 1,9kb du gène *VNN1* porcin.

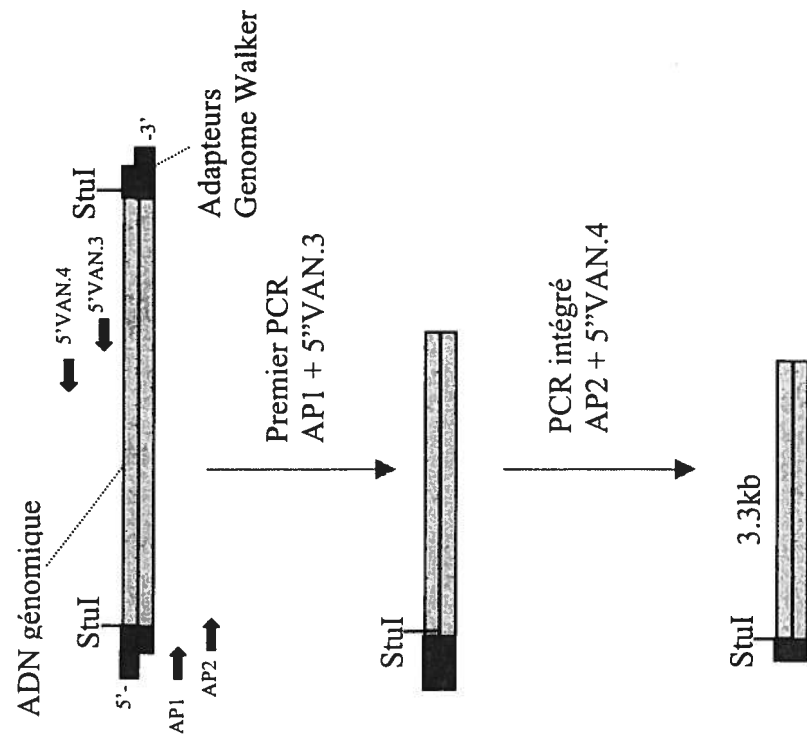
Création de mini-librairies d'ADN génomique porcine non-cloné "Universal Genome Walker" (CLONTECH)

- Digestion ADN génomique porcine avec enzymes qui laissent des extrémités franches
- Ligation avec adaptateurs "Genome Walker"

4 Mini-librairies

DraI
EcoRV
PvuII
StuI

Amplification de la séquence en amont du premier fragment de promoteur



3.1.6 Séquence de 5.15kb de la région promotrice du gène *VNN1* porcin

La séquence de 5.15kb de la région promotrice du gène *VNN1* porcin ainsi que la localisation et la direction des différentes amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage sont représentées à la figure 8. La séquence promotrice est directement en amont du codon d'initiation de la transcription (ATG) situé à la position nucléotidique 5119.

3.1.7 Comparaison des séquences promotrices du gène *VNN1* chez le porc, l'humain et la souris

Les séquences promotrices du gène *VNN1* porcin et murin ont été comparées par rapport à la séquence promotrice du gène *VNN1* humain. La figure 9 fait état de cette comparaison. Les séquences promotrices humaine et murine sont disponibles dans la banque de données internet ([//genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)) grâce aux grands projets de séquençage du génome. Les trois séquences promotrices ont été comparées sur une distance de -5kb à partir du codon d'initiation de la transcription. Six blocs d'homologie d'au moins 60% de similarité et de tailles allant de 102pb à 435pb ont été déterminés entre la séquence porcine et la séquence humaine. Les blocs ne sont pas aux mêmes positions, mais ils conservent le même ordre. Par contre, seulement deux petits blocs d'homologie (183pb et 66pb) d'au moins 60% ont pu être trouvés entre la séquence murine et la séquence humaine.

3.1.8 Recherche de sites potentiels de facteurs de transcription

À l'aide de données retrouvées dans la littérature, les séquences de sites consensus des facteurs SRY, SOX9, LHX9, WT1, SF1 et GATA ont été recherchées sur les promoteurs *VNN1* porcin, humain et murin. La figure 10 fait état des sites potentiels de liaison répertoriés sur les promoteurs *VNN1* porcin, humain, et murin.

Figure 8. Séquence de 5,15kb de la région promotrice du gène *VNN1* porcin directement en amont du codon du début de la transcription (ATG). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de ce fragment sont soulignées. Une flèche orientée indique que \rightarrow c'est une amorce sens, alors qu'une flèche orientée \leftarrow indique que c'est une amorce antisens. L'ATG se retrouve à la position nucléotidique 5118pb.

p5'VAN.F →			KpnI/p5'VAN.G →		
10	20	30	40	50	60
CCTGGCCACA	ATGCTTGCCT	TTGCAGAGGA	ATTTGTCTCA	GTAGTTAATG	ACTTTAACC
GGACCGGTGT	TACGACGGA	AACGTCTCCT	TAAACAGAGT	CATCAATTAC	TGAATTTGC
70	80	90	100	110	120
CTGCAAAAGA	ATTAGGAAG	AAATAGCTAT	TACCAGGCCA	GGAGATATA	AACCTTATCA
GACGTTTTCT	TAATTCTTTC	TTTATCGATA	ATGGTCCGGT	CCTTCTATTT	TTGGATAGT
130	140	150	160	170	180
GAGACAATAT	ATCAGTTGTG	AAGAATCCTG	GTTCTGTTTT	AAAGAAAAGT	TAGCCTTAGG
CTCTGTTATA	TAGTCACAC	TTCTTAGGAC	CAAGACAAA	TTTCTTTTCA	ATCGGAATCC
190	200	210	220	230	240
CACATTCTTA	AATTGTTTTA	CAGCTCACCA	GCCCATCAG	TACTCAACCA	CCAGGCCAAG
GTGTAGAAAT	TACACAAAT	GTCGAGTGGT	CGGGTAGTTC	ATGAGTTGGT	GGTCCGGTTC
250	260	270	280	290	300
TGGAACCTAA	GAAAGGATGA	TGCCAGCCTT	GGCTGACCCT	TGTAACCTTA	ATCAGCTGGA
ACCTTGGATT	CTTTCCTACT	ACGGTCGGAA	CCGACTGGGA	ACATTGAGAT	TAGTCGACCT
310	320	330	340	350	360
CCTTTGCCCC	AGTTCTATGC	TGAATCTTTC	TTTGCTCAAG	CCCTTTCTGA	GTATGAATGT
GGAAACGGGG	TCAGATACG	ACTTAGAAG	AAACGAGTTC	GGGAAGACT	CATACTTACA
370	380	390	400	410	420
ACCCTTACTT	AAACTTCCC	CAGTTTTGCT	GGTTGAGAGA	GCATTGTTTT	GGGAATATC
TGGGAATGAA	TTTTGAGGG	GTCAAAACGA	CCAACTCTCT	CGTAACAAA	CCCTTGATAG
430	440	450	460	470	480
CCTGATACTC	TTCTTACTGT	TAAGTAAAC	AAATCCTTCC	TACTCCTGCT	CTTTGGCTTG
GGACTATGAG	AAGATGACA	ATTCATTTTG	TTTAGGAAGG	ATGAGGACGA	GAAACCGAAC
490	500	510	520	530	540
ACTGTGTCTT	TTGGCTCAAA	ACCCATGAG	AGGTGAACCC	AGTTTTGGGG	TGACATTAGG
TGACACAGAA	AACCGAGTTT	TGGGTACTC	TCCACTTGGG	TCAAACCCC	ACTGTATCC
550	560	570	580	590	600
GATCAGGTGG	ATCACTCAG	GCATCGTAGG	AAAGCTACT	GGTGTCCAC	CAGTCCAGC
CTAGTCCACC	TAGTTGAGTC	CGTAGCATCC	TTTTCGATGA	CCACAGGTG	GTCAAGGTGG
610	620	630	640	650	660
TTAAGCTCAT	GGATGGCATT	CTCTAGCAAG	AATTGCATT	GTCCACCTAA	AGATGTTCTC
AATTCGAGTA	CCTACCGTAA	GAGATCGTTC	TTAACGTTAA	CAGGTGGATT	TCTACAGAG
670	680	690	700	710	720
TCAGCTTCTG	TGGGCCAAGT	AGGCCAGAAA	TGCCAGATTA	GGAGTTCCTG	TGGTAGCTCA
AGTCGAAGAC	ACCCGGTTCA	TCCGGTCTTT	ACGGTCTAAT	CCTCAAGGAC	ACCATCGAGT
730	740	750	760	770	780
GCAGATTAA	AACCTACTC	AGTGTCTGTG	AGGATGCAGG	TTTGTTCTTG	AAGATTAGGT
CGTCTAATTC	TTGGGATGAG	TCACAGACAC	TCCTACGTCC	AAACAAGGAC	TTCTAATCCA
790	800	810	820	830	840
TCTTGTCTAG	TTGCAGAAGG	AATTCAGAAA	TGAGATGGAA	ATTGAGAAG	AAAGTGAGG
AGAACAGATC	AACGTCTTCC	TTAAGTCTTT	ACTCTACCTT	TAACTCTTTC	TTTTACTCC
850	860	870	880	890	900
GTTTATTTAA	GTGAGAAGTA	CACCTCTTAA	GGAGAGGTGG	GCAGAGAGGT	GAGCAGCTGC
CAATAAATT	CACTCTTCAT	GTGGAGAATT	CCTCTCCACC	CGTCTCTCCA	CTCGTCGACG

910	920	930	940	950	960
CCTGTGTTTT	TTGGGTGCAC	TAGTTAGAAG	GGGTGTCCAA	TTGTATAGAT	GGGATAGTCA
GGACACAAAA	AACCCACGTG	ATCAATCTTC	CCCACAGGTT	AACATATCTA	CCCTATCAGT
970	980	990	1000	1010	1020
CTGAGAAAGT	GGGGTTTAGG	GGTCATATTC	CTTAATTTTC	ATCCCAGCTC	CACCTTCCCG
GACTCTTTCA	CCCCAATCC	CCAGTATAAG	GAATTAAAG	TAGGGTCGAG	GTGGAGGGG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AAGGGAGGAG	GGATTTTTGT	CCTTAGTTGG	TTAATTGGAA	GTGTCATGGC	ATCCACATAT
TTCCCTCCTC	CCTAAAACA	GGATCAACC	AATTACCTT	CACAGTACCG	TAGGTGTATA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AATGGGTACT	TCTTATCTGC	ATAGCTAATT	GTATTAGAAT	TTTATTATAT	GGAGGGCATA
TTACCCATGA	AGAATAGACG	TATCGATTAA	CATAATCTTA	AAATAATATT	CCTCCCGTAT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ATGAGCAACA	GGGTTCCATT	CAGACACTGG	AGATTTCGTG	CCTCTTCTAC	CTTTCTTTGT
TACTCGTTGT	CCCAAGGTAA	GTCTGTGACC	TCTAAGCACG	GGAGAAGATG	GAAAGAAACA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CTGCAGCCTG	GGCACTTATC	ACCCCAAAAA	TGTGTGGTTT	CCTATCAGTC	TGGTGTTTCC
GACGTGGGAC	CCGTGAATAG	TGGGGTTTTT	ACACACCAAA	GGATAGTCAG	ACCACAAAGG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AGCTTTTCTT	TGTCCACCCA	TGACACATT	TGTGTGATGC	GCGGTTTCTT	GCTATCTGGC
TCGAAAGAA	ACAGGTGGGT	ACTTGTGTAA	ACACACTACG	CGCCAAAGAA	CGATAGACCG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CCCAGGATCC	CCTTCTCTGC	TGATGCCTAT	CTGCCCACTC	TAACAGATTT	GATCCNTGGC
GGGTCCTAGG	GGAGAGACG	ACTACGGATA	GACGGGTGAG	ATTGTCTAAA	CTAGGNACCG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTCACTCAAT	GGGTTAAGGA	TCTGGTGTGG	ATACAGCTG	TGGCGTAGGT	CGCAGCTGCA
GAGTGAGTTA	CCCAATTCCT	AGACCACAC	TATGTTTCGAC	ACCGCATCCA	GCGTCGACGT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCCCTAAAAA	GAATAAAAAA	AGAAAGAA	AGAAATGCCA	GGTTGATTTA	GTAGTAATC
CGGGATTTTT	CTTTTTTTTT	TTCTTTCTTT	TCTTTACGGT	CCAACTAAAT	CATCATTTAG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TGGGAGGAGG	AAAGGGGTTA	TATAGCCTAG	TGATAAATCT	CCACCTTGTA	ATGGGCTTGT
ACCCCTCCTC	TTTTCCCAAT	ATATCGGATC	ACTATTTAGA	GGTGGAAACAT	TACCCGAACA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GCCCCTGGGC	TGTGACCTCG	CTCTTTTCTT	TCCCCGTAGC	TGGGACTGGC	AGGTTACAGG
CGGGGACCCG	ACACTGGAGC	GAGAAAGAA	AGGGGCATCG	ACCCTGACCG	TCCATGTCC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GGGTTAAAG	GTAAAGATG	GGATTTTTTT	TTTTTTTTCC	TGTCTCCTAG	GAAGGTTAGG
CCCAATTTTC	CAATTTCTAC	CTTAAAAAA	AAAAAAAGG	ACAGAGGATC	CTTCCATCC
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CTCTAGTAA	TTGTTTCCAC	CGAAGGCAGG	CTTTGGTTAA	GAGAAAGAA	TTCAAGGATT
GAGATCATTT	AACAAGGTG	GCTTCCGTCC	GAAACCAATT	CTCTTTTCTT	AGTCCTTAA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CCCATTTGTG	CTCAGTGGTA	ATAAACCCAA	GTAGTATCCG	TGAGGATGTG	GGTTCGATCC
GGGTACACC	GAGTCACCAT	TATTTGGGTT	CATCATAGGC	ACTCCTACAC	CCAAGCTAGG

p5'VAN.E →

← p5'VAN.8

1810	1820	1830	1840	1850	1860
CTGGCCCTC	TCAGTGGGT	AAGCATCTG	CTTTGCCCTG	AGCTGTGGT	TAGACTGCAG
GACCGGGGAG	AGTCACCCAA	TTCGTAGACC	GAAACGGGAC	TCGACCCAC	ATCTGACGTC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
ATGCAGCTTG	GATTTGGCAT	TGCTGTGGCT	GTGGTGTAGA	CTGCAGCGAT	TGGACCCACTA
TACGTCGAAC	CTAAACCGTA	ACGACACCGA	CACCCATCT	GACGTCGCTA	ACCTGGTGAT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ACCTGGGAAC	TTCCCCATGC	CGTGGGTGTG	GCCCTAAAA	AAAAGAGAGA	GAGAGAGAGA
TGGACCCTTG	AAGGGGTACG	GCACCCACAC	CGGGATTTTT	TTTTCTCTCT	CTCTCTCTCT
1990	2000	2010	2020	2030	2040
AAGAATGCC	CTGAACCTAT	TTCAAGTAG	ATGCATTTTT	CCTCTTCTGT	ACAAAGCAAA
TTTCTTACGG	GACTTGAAAT	AAGTTTCATC	TACGTAAAA	GGAGAGACA	TGTTTCGTTT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
AGGTGTTTTA	TTCCTTTATT	GGTTTTTCAG	AGATCTTGGC	TGGGCTCCTG	AAATACCGCA
TCCACAAAT	AAGGAATAA	CCAAAAAGTC	<u>TCTAGACCG</u>	<u>ACCCGAGGAC</u>	TTTATGGCGT
		← p5'VAN.7			
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CCCCCACCC	CCGGCGGCAC	CCTGCAATAT	TGTTTTTATC	TCTCAGCCT	GTCCAGTTTT
GGGGGGTGGG	GGCCGCCGTG	GGACGTTATA	ACAAAATAG	AGAGTTCGGA	CAGGTCAAAA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TACCTCTCAA	GCCTTCCACA	CTGAACCTCC	AGCAATTTGT	CCAAGACAAA	TTGGAGTGAT
ATGGAGAGTT	CGGAGGGTGT	GACTTGGAGG	TCGTTAACA	GGTTCTGTTT	ACCCTCACTA
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CGTATCAGGA	GACTTGCTCC	AACAGGAGAC	TTCTACTGCA	GGTAGCCTG	TCTCTCTAAC
GCATAGTCCT	CTGAACGAGG	TTGTCCCTCG	AAGATGACGT	CCATTCCGAC	AGAGAGATTG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TGGCCACAGT	GACTCATCCT	GTGACTTCAG	TTCTCTGATA	TATCTAAAAA	GTTACTGCTT
ACCGGTGTCA	CTGAGTAGGA	CACTGAAGTC	AAGAGACTAT	ATAGATTTTT	CAATGACGAA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TTCAATTTGT	CAGTTTCTTT	CTTGTTGAGA	TAGGAGCAAT	GACTTCTTGG	CTGAAAGAAA
AAGTAACAA	GTCAAAGAAA	GAACACTCT	ATCCTCGTTA	CTGAAGAAC	GACTTTTCTT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
GTCTGAGCAA	TGACTAGAGC	CTTGTGTTAC	ATCAGATGG	GAACACACTA	GGAGCTTCTT
CAGACTCGTT	ACTGATCTCG	GAACACAATG	TAGTCTTACC	<u>CTTGTGTGAT</u>	<u>CCTCGAAGAA</u>
			← p5'VAN.6		
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ATTTAATCTT	TTTATTCTAC	TAAATCAAA	GAGTAATTC	TCTTTGTCTC	TTAGTGACCC
TAAATTAGAA	AAATAGATG	ATTTAGTTT	CTTCATTAG	AGAAACAGAG	ATCACTGGG
2530	2540	2550	2560	2570	2580
ATCCAGTTT	TACTTTTAT	TTCAAGACGT	CCTTTATTGT	TATGTCATGA	TGGCATCTCC
TAGGTCAAA	ATTGAAATA	AAGTCTTGCA	GGAAATAACA	ATACAGTACT	ACCGTAGAGG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
TTGTACAAGA	TTAGTAATA	GAAACCTTAA	TTAAATAGAG	TTGTGGGAGA	CCAGAGGGGG
AACATGTTCT	AATCATTTAT	CTTTGGATT	AATTTATCTC	AACACCTCT	GGTCTTCCCC
2650	2660	2670	2680	2690	2700
GAGATCTCAT	GCCCCATGAC	AATAACGAGC	CAAAACAGGG	GGGAGACCA	CTTCCTTCTT
CTCTAGAGTA	CGGGGTACTG	TTATTGCTCG	GTTTGTTCCT	CCCTCTGGTG	GAGGGAGAAA

2710	2720	2730	2740	2750	2760
CCTGCTGAGG	ACTCAGCCAG	TGAAAAGCCT	TGGGGTTTTT	GTTTAGCTGC	CCCACCCTGC
GGACGACTCC	TGAGTCGGTC	ACTTTTCGGA	ACCCCAAAAA	CARATCGACG	GGGTGGGACG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CTTTTCCTCT	CTATAAAGC	ATTCTCCTTC	CCTTGCCTTG	CGGAGGCTCA	CCGTGGTTGC
GAAAGGGAGA	GATATTTTCG	TAGAGGGAAG	GGACCGGAAC	GCCTCCGAGT	GGCACCACAC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
AGCTCCTGAA	TGGCAATTCT	CTGCTGATGC	CAAGTAAGCC	CACCTTTGCT	GGAATAATAG
TCGAGGACTT	ACCGTTAAGA	GACGACTACG	GTTCAATTCGG	GTGGAACCGA	CCTTTTTATC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
CTGGTAGCGT	GTTTCAGGTC	AGCATCCTTG	CGAGGTGTGT	GTATCCCCAT	CTCCTGGGAC
GACCATCGCA	CRAAGTCCAG	TCGTAGGAAC	GCTCCACACA	CATAGGGGTA	GAGGACCCTG
← p5'VAN.5					
2950	2960	2970	2980	2990	3000
TGGAAAGCCT	GAAGGGGGTC	AGTTAGCAGA	GGGGGCTGGA	TGTAGGAAGA	CAGAACAAAC
ACCTTTTCGGA	CTTCCCCCAG	TCATCGTCT	CCCCCGACCT	ACATCCTTCT	GTCTTGTTTG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
ATGGTCTCTT	GATTACTTTG	GCAGCCACAG	AATAAATTTG	CTATAGTACT	GAAGTAAAAA
TACCAGAGAA	CTATGAAC	CGTCGGTGTC	TTATTTAAAC	GATATCATGA	CTTCATTTTT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
AAAAAAAAAT	TTTGATCTC	CCTTCGNGGC	TCAGTGGTTA	ACAAACCCCA	CTAGGGTCCA
TTTTTTTTTA	AAACCTAGAG	GGAGCNC CG	AGTCACCART	TGTTTGGGGT	GATCCCGGT
3130	3140	3150	3160	3170	3180
TGAAGATTCC	GGTTCGATCC	CTGACCTCGC	TCAGTGGGTT	AACCATCCGG	TGTTGCCATG
ACTTCTAAGC	CCAAGCTAGG	GACTGGAGCG	AGTCACCCAA	TTGGTAGGCC	ACAACGGTAC
3190	3200	3210	3220	3230	3240
AGCTATGGTG	GAGGTTGCAG	ATGCTGCTCG	GATCTGGCAT	TGCTGTGGTT	GTGGTGTAGG
TCGATACCAC	CTCCACGTC	TACGACGAGC	CTAGACCGTA	ACGACACCAA	CACCACATCC
3250	3260	3270	3280	3290	3300
CCAGCGGCTG	CAGCTCCAAT	TTGACCCCTA	GCCTGGGAAC	TTTCATATGC	TGAGAGTGTG
GGTCGCCGAC	GTCGAGGTTA	AACTGGGGAT	CGGACCCTTG	AAAGTATACG	ACTCTCACAC
← p5'VAN.4					
3310	3320	3330	3340	3350	3360
ACCCAAAAAA	GCAAAAAGCA	AAAAGCAAAA	AAAAAAAAAA	AAATCAGACA	TACTCATTTA
TGGGTTTTTT	CGTTTTTCGT	TTTTCGTTTT	TTTTTTTTTT	TTTAGTCTGT	ATGAGTAART
3370	3380	3390	3400	3410	3420
CARATGGAGC	TATAAGATA	CCATCCTAAG	CGAATCTCC	AAACGAATGA	TCATGACACAC
GTTTACCTCG	ATATTTCTAT	GGTAGGATTC	GCTTTAGAGG	TTTGCTTACT	AGTACTTGTG
← p5'VAN.3					
3430	3440	3450	3460	3470	3480
CAATTCTCTA	AATCTGAAAA	CATGTAGTAC	TTAATTCACA	AATAAATGA	AATTTACCTC
GTTAAGAGAT	TTAGACTTTT	GTACATCATG	AATTAAGTGT	TTATTTTACT	TTAARTGGAG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TTTATTCCAG	GCCATATCT	GTGAGCTCTT	TCTCTATTTT	TTTTTATTAT	TTCCCTCTCT
AAATAAGGTC	CGGTATTAGA	CACTCGAGAA	AGAGATAAAA	AAAAATAATA	AGGGGAGAGA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
TCTCTTTCCC	TCTTGTTCTC	CCTCTCATT	TTATTTTTTT	AAACAGTCAC	ACTCATGGCC
AGAGAAAGGG	AGACAAGAG	GGAGAGTART	AATAAAAAAA	TTTGTCAGTG	TGAGTACCGG

```

      3610      3620      3630      3640      3650      3660
AGAGATTCTG GCCACACATT CTGGCCAGAG ATCAAAACCA AGTCCTCATG GATACTATTT
TCTCTAAGAC CGGTGTGTAA GACCGGTCTC TAGTTTTGGT TCAGGAGTAC CTATGATAAA

      3670      3680      3690      3700      3710      3720
GGGTTCTGTTA CCACTGAGCC ACAAGTGGAA CTCCATCCCC AGTCCTGTTT TGAGCAAGGG
CCCAAGCAAT GGTGACTCGG TGTTCACCTT GAGGTAGGGG TCAGGACAAA ACTCGTTCCTC

      3730      3740      3750      3760      3770      3780
GACCTGGGCT GGAGGCACCC AGCTAAGCTT TCCCTGGATT CCTGACTCAC AGAAATGTT
CTGGACCCGA CCTCCGTGGG TCGATTGCAA AGGACCTAA GGA CTGAGTG TCTTTTACAA

      3790      3800      3810      3820      3830      3840
AGTAATCTA TACCGGCTGT TGGAGCCGC TACTTTTGGA GGTGATTTT TTACATAGGA
TCTATTAGAT ATGCCGACA ACCTTCGGCG ATGAACCTT CCCACTAAA AATGTATCCT

      3850      3860      3870      3880      3890      3900
ATAGACAAC AGTAACCTT TTATATCCC CCTTGCCTG GCTTCCTCAT TTCGAGGAAA
TATCTGTTGA TCATTGGGA AATATAGGG GGAACAGGAC CGAAGGAGTA AAGCTCCTTT

      3910      3920      3930      3940      3950      3960
CTAAGTGAA CAAAGTATGA AGCTCAAGA GTCACCTGAG GATAGTAATA ATCATTTAAA
GATTTCACTT GTTTCATCT TCGAGTTTCT CAGTGGACTC CTATCATTAT TAGTAATTT

      3970      3980      3990      4000      4010      4020
AATTGAAAG TTATTTATTC TTCAATTAC ATACATTGCC ATGGGTTGAA GTTCTAAAT
TAACTTTTC AATAAATAG AGTTTATG TATGTACGG TACCCACTT CAAGATTTTA

      4030      4040      4050      4060      4070      4080
GTATAATTC TAGAAGTCA TATGTTTTCA AGTCCTAACC ACCTGTACCT CAGACTTAT
CATATTTAG ATCTTTCAGT ATACAAAGT TCAGGATTGG TGGACATGGA GTCTTGATA

      4090      4100      4110      4120      4130      4140
TTGGAGATAA GATCATTTCA GATATAATTA GTTCAGATGA GGTGAGACA GAGTCAGGTG
AACCTCTATT CTAGTAAGT CTATATTAAT CAAGTCTACT CCAGTCTTGT CTCAGTCCAC

      4150      4160      4170      4180      4190      4200
GGAACAAAC CCATTGTCTG GTGTCCTTAA AAATAAGGA AGTTTGGACC CAGATGTGCA
CCTTGATTTG GGTACAGAC CACAGGAATT TTTATTTCTT TCAACCTGG GTCTACAGT

      4210      4220      4230      4240      4250      4260
CACAGGGAGA AGACAGCCAA ATGCAGAGGC ATGACAGGT CTTTCCCAA CAGCCCTTAG
GTGTCCCTCT TCTGTGGTT TACGTCTCCG TACTTGTCCA GAAGGGTTT GTCGGGAATC

      4270      4280      4290      4300      4310      4320
GAAGAGCAA CACTGCTGAC TCCTCTTCTG AATTTCTAGC TTCCAGATT GCAGACAGT
CTTCTTCGTT GTGACGACTG AGGAGAGAC TTAAAGATCG AAGGTCTTAA CGTTCTGTCA

      4330      4340      4350      4360      4370      4380
ACATTTCTGT TGTTTAGCC ACCCAGTGTG TTGCACTTTT TTAGTACAAC CCTAGCAAT
TGTAAGACA ACAATTCCG TGGGTCAAC AACGTGAAA ATCATGTTG GGATCGTTTA

      4390      4400      4410      4420      4430      4440
GGTCATACAT GCATTTTCTT ATTTGATGCT TACGACCCC TGCAAAAAG GGAGTTCAT
CCAGTATGTA CGTAAAGTA TAACTACGA ATGCTTGGGG ACGTTTTTC CCTTCAAGTA

      4450      4460      4470      4480      4490      4500
TTGTTACATA ATATTTGTTT ACATACACAT GTCTATGATG TAAACCATG AACTTTTCTT
AACATGTAT TATAACAAA TGTATGTGTA CAGATACTAC ATTTTGGTAC TCTGAAGAA

```



```

      4510      4520      4530      4540      4550      4560
TTTTAAAAAA AATTGAGGT GTAGTTGATT TGCAATGTTG TGTTCGTTTC AGGTGTACAG
AATTTTTTTT TTAACTTCA CATCAACTAA ACGTTACAA CAAACAAAG TCCACATGTC

      4570      4580      4590      4600      4610      4620
CAAAGTGACT CAGATACACA CACAAACACA CACATATATA TTCTTTTTC AAGTCTTTTC
GTTTCACTGA GTCTATGTGT GTGTTTGTGT GTGTATATAT AAGAAAAAGT TTCAGAAAG

      4630      4640      4650      4660      4670      4680
CCTTATAGTT TTTTTTGTG TTGTTTGTG TTTTGTGTTT TTTTTTTAT CTTTTTAGGA
GGATATCAA AAAAAACAA AACAAAAACA AAAAACAAAA AAAAAAATA GAAAAATCCT

      4690      4700      4710      4720      4730      4740
CTGCACCCAC AGCATATGGA AGTCCCAGG CTAGGGGTCC ATTCGGAGCT ACAGCTGCTG
GACGTTGGTG TCGTATACCT TCAAGGGTCC GATCCCCAGG TTAGCCTCGA TGTCGACGAC
                                     ← pVAN.12
      4750      4760      4770      4780      4790      4800
GCCTATGCCA CAGCCACGGC GATGCTAGAT TCAAGCTGCA TCTGCGACCT ACACCACAGC
CGGATACGGT GTCGGTGCCG CTACGATCTA AGTTCGACGT AGACGCTGGA TGTGGTGTCC
                                     ←
      4810      4820      4830      4840      4850      4860
TCATGGTAAT GCCAGATCCT TAACCCATTA AGCGAGGCCA GGGATTGAAC CTGCGTCCTC
AGTACCATTA CGGTCTAGGA ATTGGGTAA TCGCTCCGGT CCCTAACTTG GACGCAGGAG
pVAN.13
      4870      4880      4890      4900      4910      4920
ATGGACACCA GTCAGATTG TTTCCCTGA GCCACAGCAG GAATCCTTT TCCCTTATAG
TACCTGTGGT CAGTCTAAC AAAGGGGACT CGGTGTCGTC CTTGAGGAAA AGGGATATC

      4930      4940      4950      4960      4970      4980
ATTTTACAA GATATTGAGT ATAGGTCCTT GGGCTGTGCA GTAGCTCCTT GTTAGTTTTT
TAAAAATGTT CTATACTCA TATCCAGGA CCCGACACGT CATCGAGGAA CAATCAAAAG

      4990      5000      5010      5020      5030      5040
ATCCAGCTTT CTTCAAGTGA GTTTTTGTCC TTTATTTTGG AAGTACTAAG TTCTAGGAAC
TAGGTCGAAA GAGGTTCACT CAAAAACAGG AAATAAAAC TTCATGATTC AAGATCCTTG

      5050      5060      5070      5080      5090      5100
CACGTGATTT ATTGCGTTTT CACTCTATA ATATCAGGGC TTGTTCTCTT TGTTCCTCAG
GTGCACTAAA TAACGCAAAA GTGAGATATT TATAGTCCCG AACAGAGAA ACAAAAGTC
                                     ←
      5110      5120      5130      5140      5150      5160
CAGCTGTTGG ACTTCAGCATG.....
GTCGACACCC TGAAGTCGTAG.....

```

Agel/ATG/p5'VAN.10

Figure 9. Comparaisons entre les séquences 5'flanquantes du gène *VNN1* chez le porc, l'humain et la souris. Les blocs d'homologie sont représentés par des rectangles. La longueur en pb et le degré de similarité (%) sont indiqués juste au-dessus des rectangles. Les rectangles gris représentent la comparaison de l'homologie entre la séquence porcine et la séquence humaine. Les rectangles hachurés représentent la comparaison entre la séquence humaine et la séquence murine. Les lignes parallèles entre les espèces correspondent à la conservation d'un ou de plusieurs blocs d'homologie.

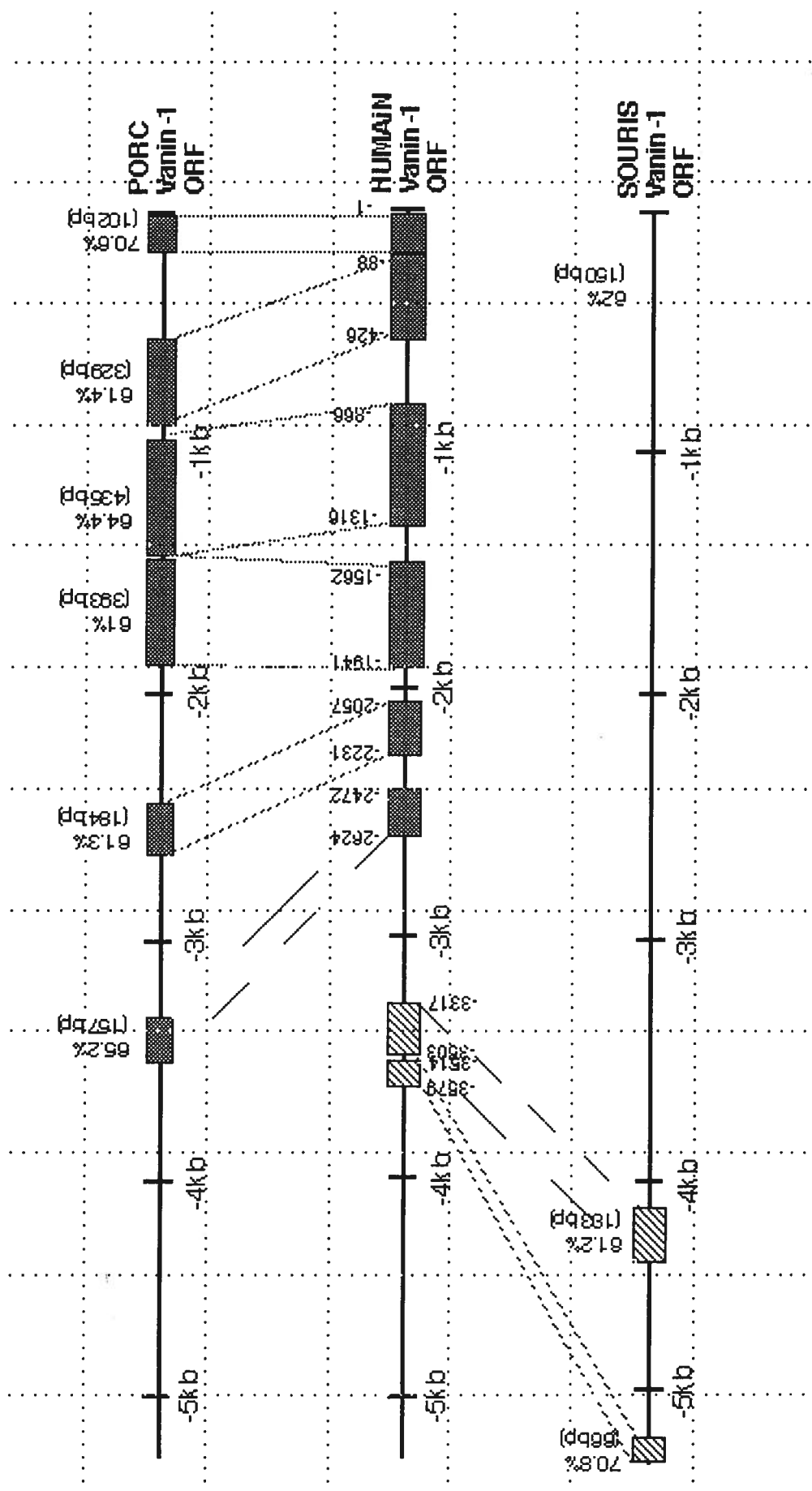
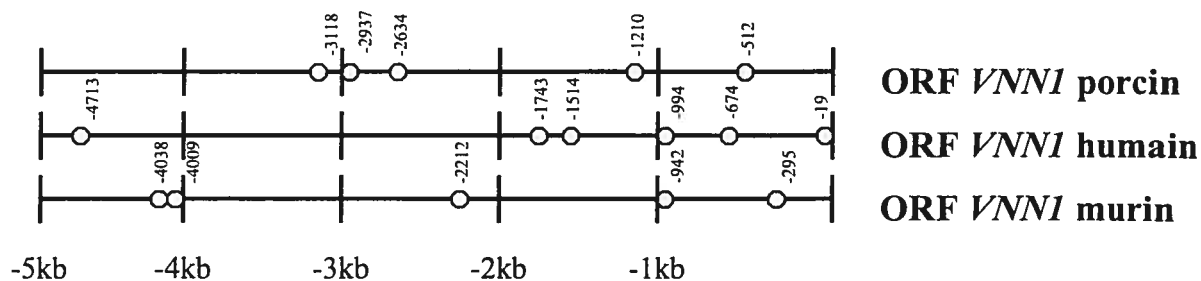
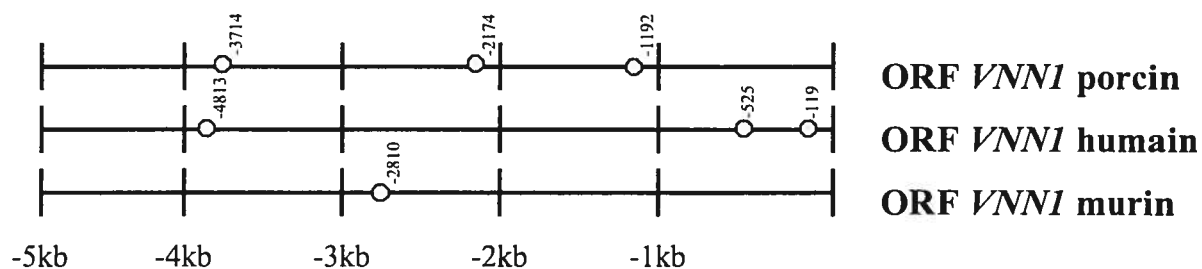
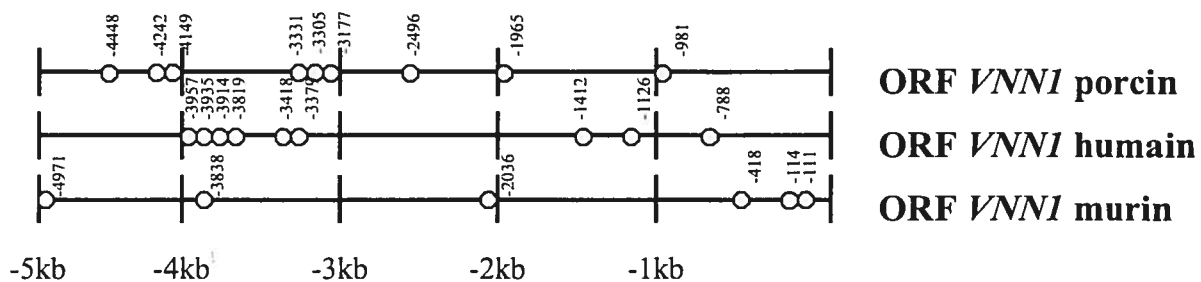


Figure 10. Sites de reconnaissance potentiels de facteurs de transcription impliqués lors de la détermination du sexe sur le promoteur du gène *VNN1* chez différentes espèces.

○ = 1 site consensus

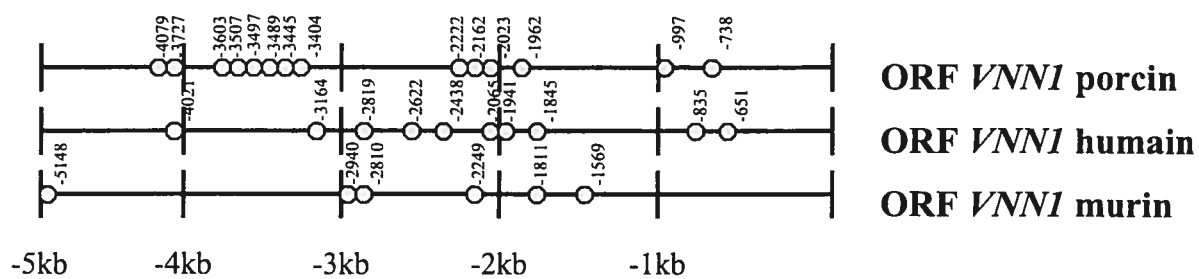
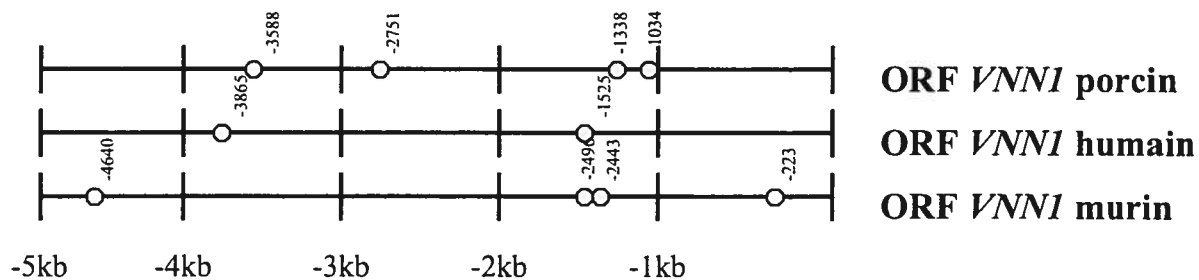
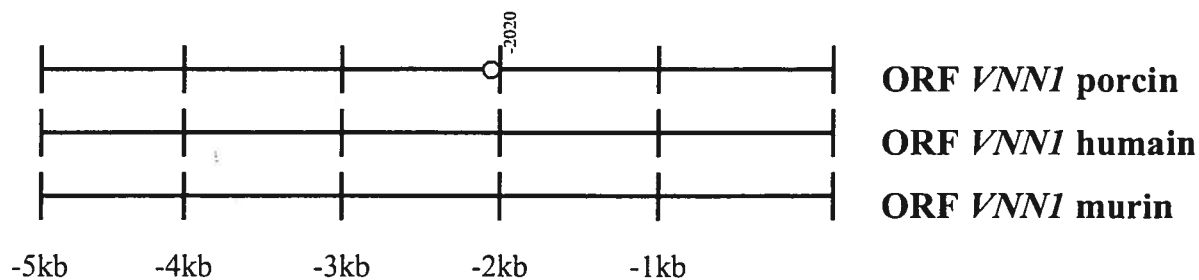
SRYséquence consensus: (a/t)(a/t)CAAAG (Nasrin *et al.*, 1991; Harley *et al.*, 1994)**SOX9**séquence consensus: AGAACAATGG (Mertin *et al.*, 1999)**WT1**

séquence consensus: GTGGG (Hossain et Saunders, 2001)



SF1

séquence consensus: GGTc/tA (Parker et Schimmer, 1997)

**GATA**séquence consensus: (a/t)GATA(g/a) (Viger *et al.*, 1998)**Lhx9**séquence consensus: TAACAA (Wilhelm *et al.*, 2002)

3.1.9 Études de co-transfections du promoteur du gène *VNN1* porcin dans les cellules CV-1

Différents facteurs de transcriptions impliqués lors de la détermination du sexe ont été testés afin de déterminer si l'un d'eux pouvait exercer un effet direct sur l'expression du gène *VNN1* porcin. Parmi les facteurs étudiés (SRY porcin, SOX9 porcin, Sox9 murin, WT1 porcin, Sfl murin, Gata4 murin et Lhx9 murin), seulement les facteurs SOX9 porcin, Sox9 murin et Gata4 murin semblaient avoir un effet direct sur le promoteur *VNN1* porcin. La figure 11 montre l'effet inhibiteur du facteur Gata4 murin sur l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur *VNN1* porcin. Pour une quantité croissante de construction CMVp-GATA4 murin, l'expression du vecteur rapporteur diminue. À une concentration de 100ng/puits de CMVp-GATA4 murin, l'expression est réduite d'au moins 2 fois par rapport à l'expression du contrôle sans Gata4 murin. La figure 12a fait état de la transactivation du promoteur *VNN1* porcin par le facteur SOX9 porcin. La transactivation est optimale lorsque 100ng de CMVp-SOX9porcin est co-transfecté avec 10ng de construction 5kb pVNN1p-GFP. Il en résulte une activation d'au moins deux fois par rapport au contrôle sans CMVp-SOX9 porcin. Le même effet de transactivation du promoteur *VNN-1* porcin a aussi été observé lorsqu'on utilisait le facteur Sox9 murin au lieu du facteur SOX9 porcin (figure 12b). Par contre, l'activation optimale est observée à une concentration de 50ng/puits de CMVp-SOX9 murin.

3.1.10 Étude comparative *in vitro* de l'effet du facteur SOX9 sur le promoteur *VNN1* chez le porc, l'humain et la souris

Toujours dans les cellules CV-1, l'effet des facteurs SOX9 porcin et murin a été comparé entre les promoteurs *VNN1* porcin, humain et murin. La figure 13 montre les résultats des co-transfections. Comme vu précédemment, les facteurs SOX9 porcin et murin transactivent le promoteur *VNN1* porcin (figure 13a). L'activation est optimale à une concentration de 50ng/puits. En ce qui concerne le promoteur *Vanin-1* murin (figure 13b), ni le facteur SOX9 porcin, ni le facteur Sox9 murin ne semblent avoir un effet sur l'expression du marqueur GFP. Dans le cas du promoteur *VNN1* humain (figure 13c), le

Figure 11. Effet d'inhibition sur les séquences 5'flanquantes du gène *VNN1* porcin par le facteur Gata4 murin. Cette étude a été faite dans les cellules CV-1. 10ng de la construction 5kb pVNN1p-GFP a été co-transfecté avec différentes quantités (en ng/puits) de vecteur d'expression qui contient la séquence codante du facteur Gata4 murin sous le contrôle d'un promoteur CMVp. La quantité totale d'ADN a été gardée constante en complétant avec le vecteur pBK-CMV sans insert. Pour l'analyse graphique, la fluorescence basale de la construction 5kb pVNN1p-GFP seule a été déterminée à 1X . Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,0048$ comparaisons multiples par Tukey-Kramer $P < 0,05$.

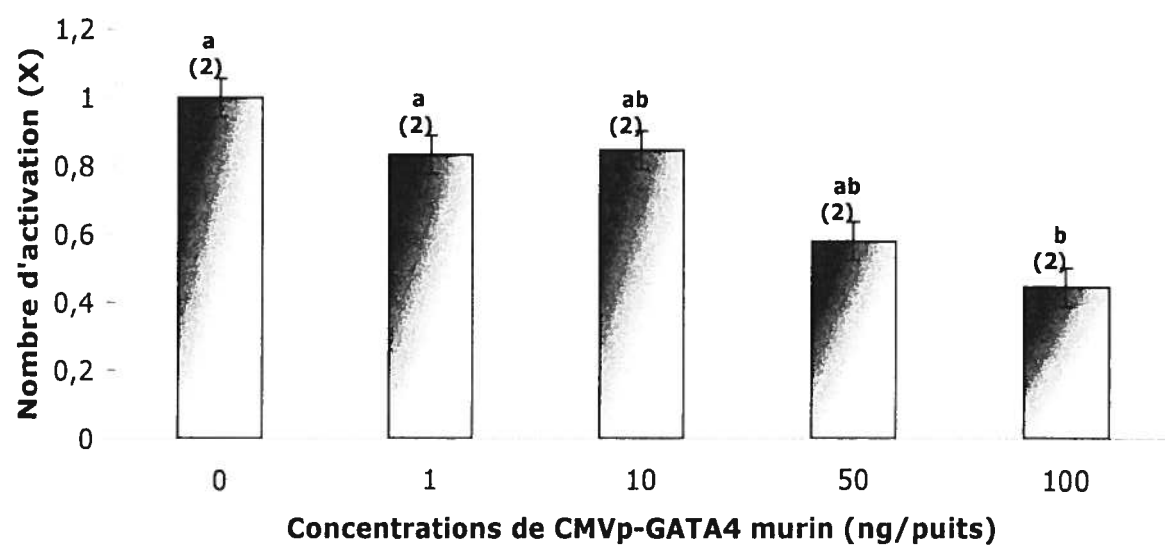
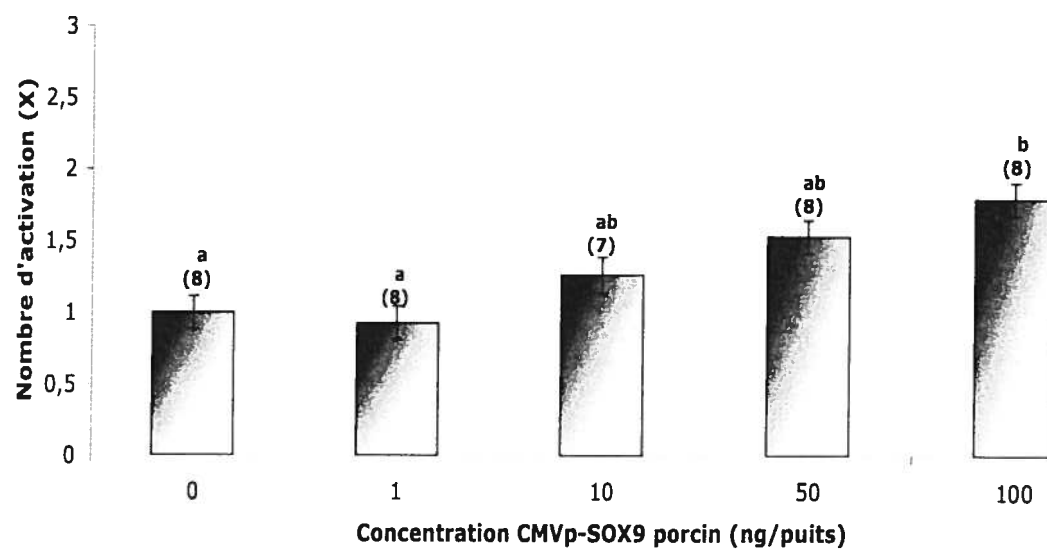


Figure 12. Effet de transactivation de la séquence porcine 5' flanquante du gène *VNN1* par les facteurs SOX9 porcine et murin. A) 10ng de la construction 5kb pVNN1p-GFP ont été co-transfectés avec différentes quantités (en ng/puits) de vecteur d'expression qui contient la séquence codante du facteur SOX9 porcine sous le contrôle d'un promoteur CMVp. B) 10ng de la construction 5kb pVNN1p-GFP ont été co-transfectés avec différentes quantités (en ng/puits) de vecteur d'expression qui contient la séquence codante du facteur Sox9 murin sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Dans les deux cas, les transfections transitoires ont été effectuées dans les cellules CV-1. La quantité totale d'ADN a été gardée constante en complétant avec le vecteur pBK-CMV sans insert. Pour l'analyse graphique, la fluorescence basale de la construction 5kbpVNN1p -GFP seul a été déterminée à 1X. Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,0000$ (A) et $P < 0,0006$ (B); comparaisons multiples par Tukey-Kramer $P < 0,05$.

A)



B)

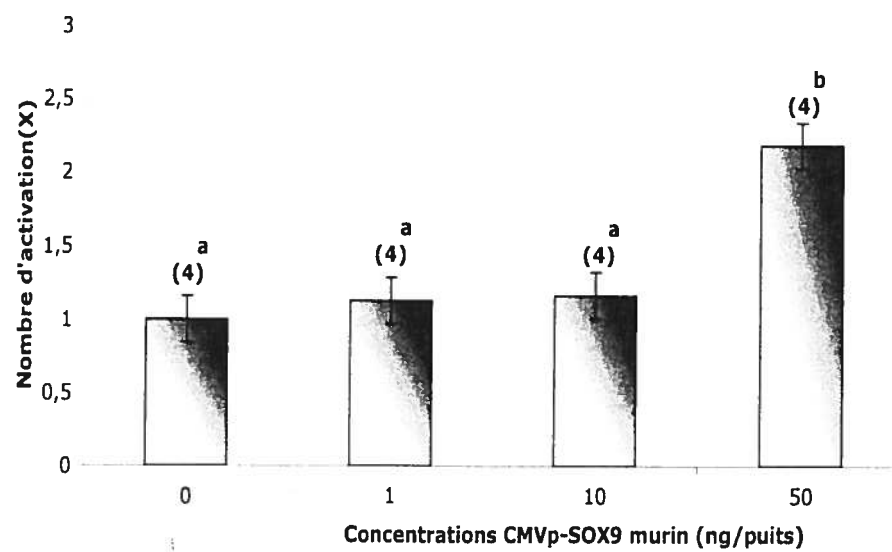
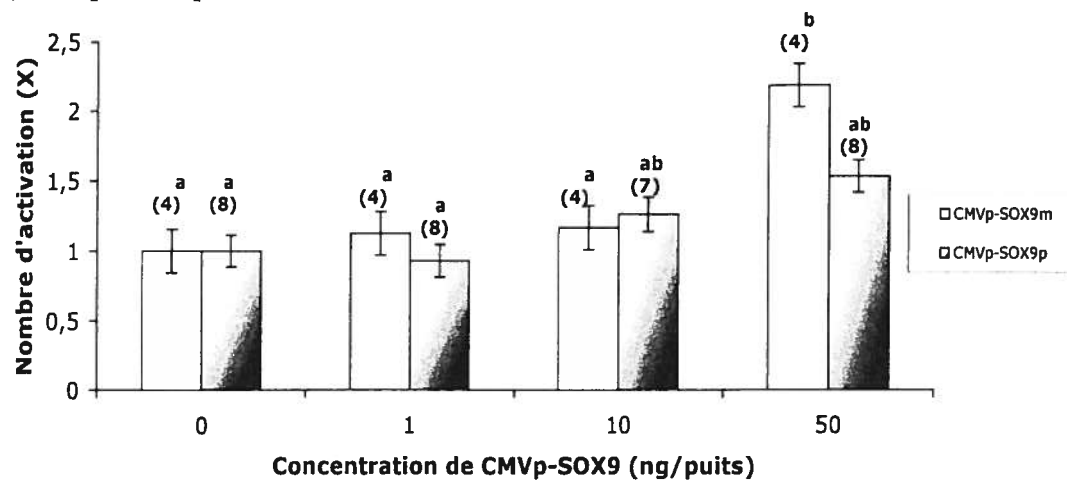
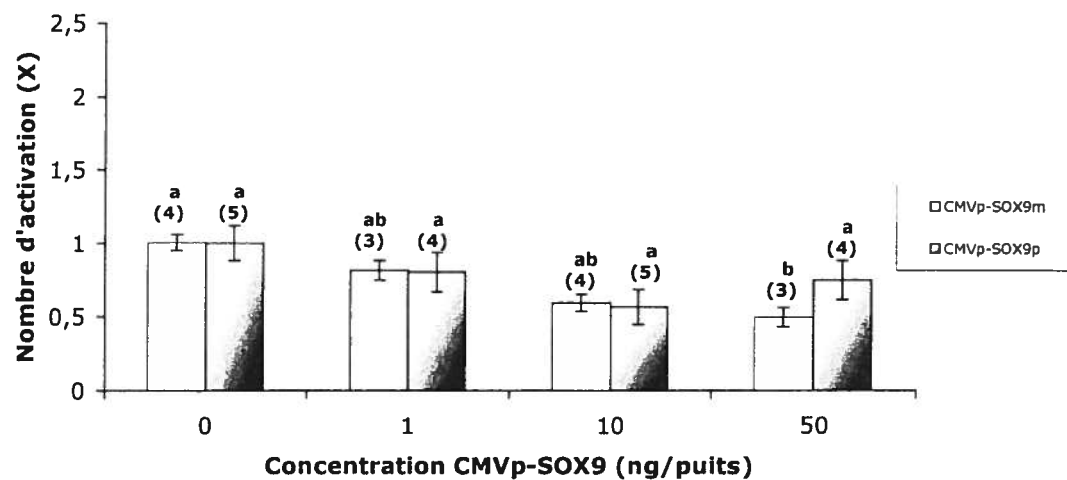


Figure 13. Effet des facteurs SOX9 porcin et Sox9 murin sur les séquences 5'flanquantes des gènes *VNN1* porcin (A), humain (B) et murin (C). Ces études ont été exécutées dans les cellules CV-1. 10 ng de chaque construction de promoteur *VNN1* (5kb pVNN1-GFP, 5kb hVNN1-GFP et 5kb mVNN1-GFP) ont été co-transfectés avec des quantités croissantes (ng/puits) de vecteurs d'expression contenant soit la séquence codante du facteur SOX9 porcin, soit la séquence codante du facteur Sox9 murin sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Dans chaque cas, la quantité totale d'ADN est gardée constante en utilisant des quantités variables de vecteur pBKCMV sans insert. Pour l'analyse graphique, la fluorescence basale des constructions VNN1(p, h ou m)5kb-GFP seules a été déterminée à 1X. Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,000$ pour CMVp-SOX9p et $P < 0,0006$ pour CMVp-SOX9m (A), $P < 0,1265$ pour CMVp-SOX9p et $P < 0,0007$ pour CMVp-SOX9m (B), $P < 0,3349$ pour CMVp-SOX9p et $P < 0,1836$ pour CMVp-SOX9m (C). Les comparaisons multiples ont été effectuées par Tukey-Kramer $P < 0,05$.

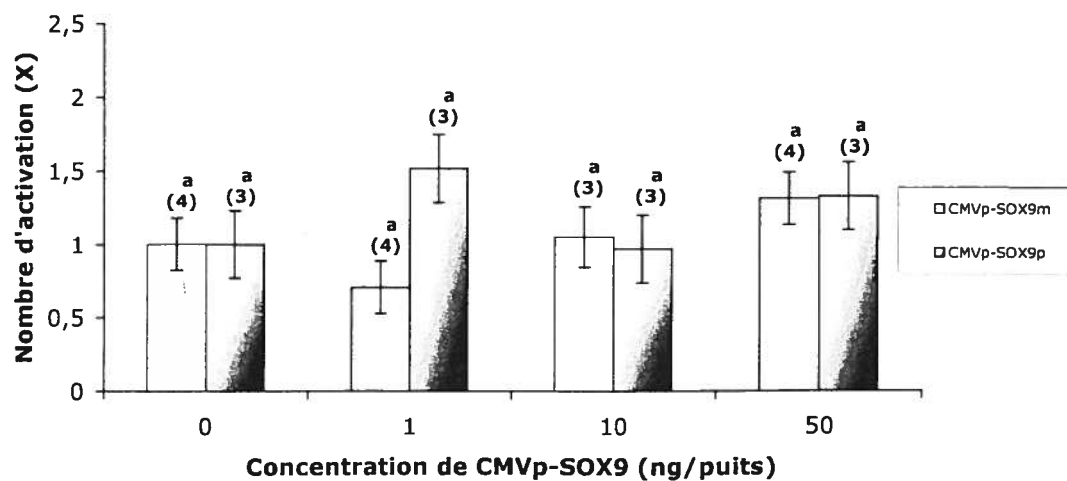
A) 5kb pVNN1p-GFP



B) 5kb hVNN1p-GFP



C) 5kb mVNN1p-GFP



facteur SOX9 porcin ne semble avoir aucun effet alors que le facteur Sox9 murin semble inhiber l'expression à plus forte concentration (50ng/puits).

3.2 GÈNE *PNI* PORCIN

3.2.1 Amplification de la séquence de l'ADNc du gène *PNI* porcin

La figure 14 résume les étapes du clonage de la séquence de l'ADNc du gène *PNI* porcin. Un premier fragment interne d'ADNc de 834pb a été cloné par PCR à l'aide des amorces hétérologues NEX.B et NEX.2 (table III, p.77) sur une RT réalisée à partir de l'ARN total de rein de porc en utilisant l'amorce inversée NEX.1 (table III, p.77). Afin d'obtenir la séquence de l'extrémité 3' de l'ADNc du gène *PNI* porcin, l'amorce ADT7T17 (tableau) qui reconnaît la queue poly(A)+ de l'ARNm a été utilisée pour faire la RT. Les amorces NEX.D (table III, p.77) et ADET7 (table II, p.59) ont été utilisées pour produire un fragment de 885pb. Dans le but de produire la séquence codante de l'ADNc au complet, le bout 5' contenant le codon d'initiation de la transcription (ATG) a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de porc à l'aide de l'amorce hétérologue NEX.F et de l'amorce spécifique pNEX.4. Un fragment de la taille de 406 pb a ainsi été produit. L'ensemble des séquences des trois fragments d'ADNc a permis d'obtenir la séquence codante complète du gène *PNI* porcin.

3.2.2 Séquence partielle de l'ADNc du gène *PNI* porcin

La séquence partielle de l'ADNc du gène *PNI* porcin ainsi que la localisation et la direction des différentes amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage ont été représentées à la figure 15. Cette séquence de 1955pb a aussi été soumise à la banque de données internet GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sous le numéro d'accès AY059415. Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 20 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 1213. À partir de cette séquence,

Figure 14. Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène *PN1* porcin.

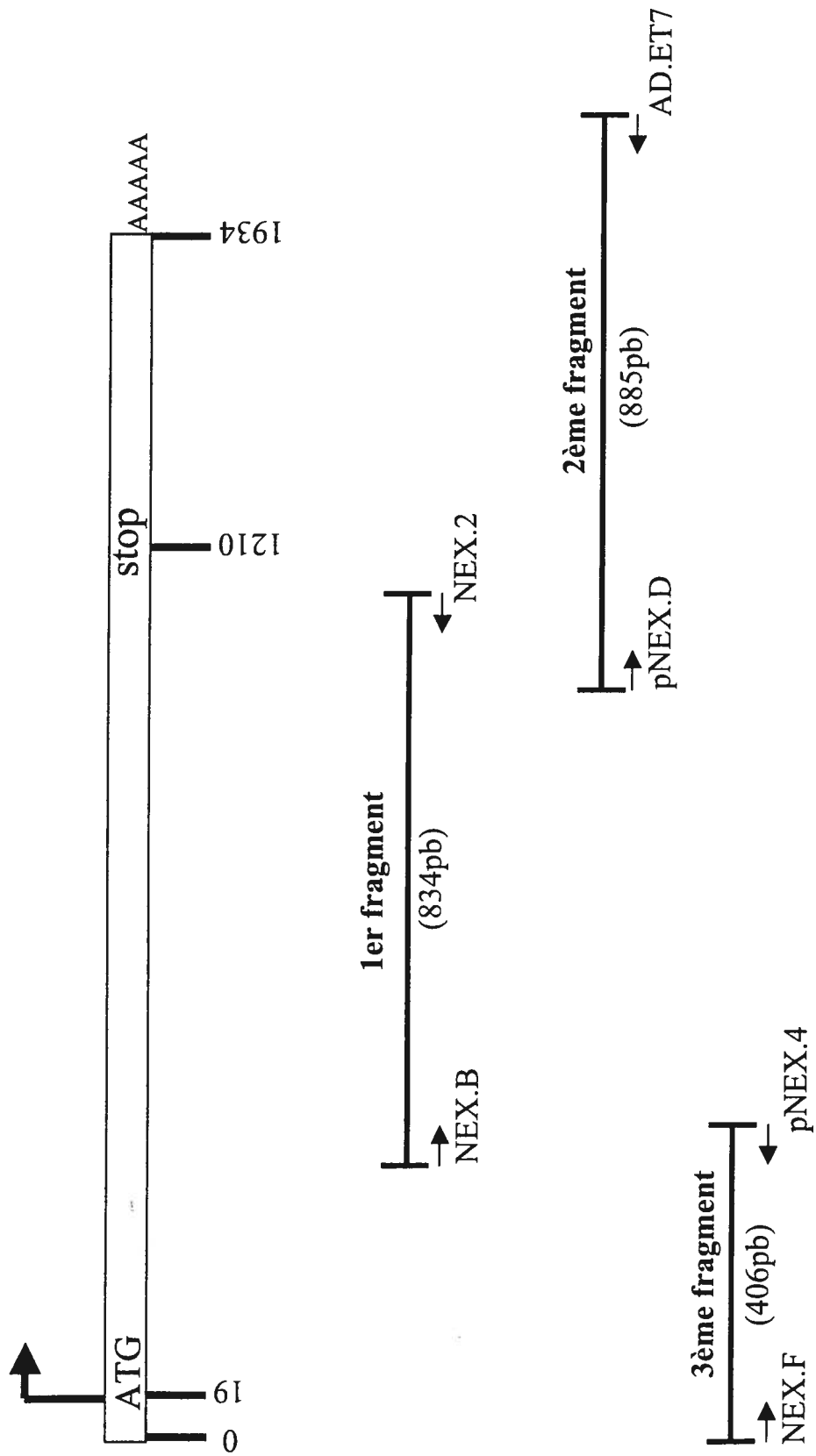


Figure 15. Séquence complète de la séquence codante du gène *PN1* porcin. Les amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène sont soulignées. Une flèche orientée → indique que c'est une amorce sens, alors qu'une flèche orientée ← indique que c'est une amorce antisens. Les deux premiers encadrés identifient le début et l'arrêt de la transcription de ce gène. Les deux derniers encadrés entourent les queues poly(A)⁺ du transcrit.

hNEX.F →
 10 20 30 40 50 60
 GTCTTTGGTG GAAGGARACCA TGATTGGCA TTTTCCCTTC TTCCTCGTGG CCACCGTGAC
 CAGGAACCACT CTTCCTTGGT ACTTAACCGT AAAGGGGAG AGGAGCACC GGTGGCACTG
 70 80 90 100 110 120
 GCTGCCTTCC GTGTGCTCCC AGTTCAACCC TCTGTGCTG GAGGAACCTG GCTCCGACAC
 CGACGGAGGG CACACGAGGG TCAGTTGGG AGACAGCGAC CTCCTTGAGC CGAGGCTGTG
 130 140 150 160 170 180
 AGGATCCAG GTTTTCATC AGATTGTCAA GTCCCGGCCT CATGACAACA TCGTCATTTT
 TCCTTAGGTC CAAAGTTAG TCTAACGTT CAGGGCCGGA GTACTGTTGT AGCAGTAAG
 190 200 210 220 230 240
 CCCCCACGGN ATTGCGTCGG TGCTGGGGAT GCTGCAGCTG GGAGCTGACG GCAGGACCA
 GGGGGTGCCN TAACGCAGCC ACGACCCCTA CGACGTCGAC CCTCGACTGC CGTCCTGGTT
 NEX.A →
 250 260 270 280 290 300
 GAGCAGCTT ACCACAGTGA TGAGTACGG CGTGACGGA GTCGGTAAG TGTTAAGAA
 CTTCGTCGAA TGGTGTCACT ACTCTATGCC GCACCTGCCT CAGCCATTTT ACATTTTCTT
 NEX.B →
 310 320 330 340 350 360
 GATCAACAAG GCCATCGTCT CCAAGAGAA TAAGATATT GTGACCGTGG CCACGCCCGT
 CTAGTTGTTT CGGTAGCAGA GGTCTTCTT ATTTCTATAA CACTGGCACC GGTGCGGCA
 370 380 390 400 410 420
 GTTTGTGAAG AATGGCTTCA AATGGAGT GCCTTTTCGT ACGAGGARCA AAGACGTGTT
 CAACACTTC TTACCGAGT TTACCTTCA CGGAAGCAG TGCTCCTTGT TTCTGCACAA
 430 440 450 460 470 480
 TCAGTGTGAG GTCCGGACG CAGACTTTGA GGATCCAGCC TCTGCCTGTG ACTCCATCAA
 AGTCACACTC CAGGCCTTGC GTCTGAARCT CCTAGGTCGG AGACGGACAC TGAGGTAGTT
 490 500 510 520 530 540
 CCTGTGGGTT CGAACGAAA CCCGGGGTAT GATCGACAGC CTGCTGTCCC CAGATCTTCT
 GGACACCCAA GCTTTGCTTT GGGCCCCATA CTAGCTGTGG GACGACAGGG GTCTAGAGA
 550 560 570 580 590 600
 CGACAGTGTC CTCACCAGAC TGGTTCTGGT CAATGCGGTG TATTTTAAGG GTTTGTGGAA
 GCTGTACAG GAGTGGTCTG ACCAAGACCA GTTACGCCAC ATAAATTCC CAACACCTT
 610 620 630 640 650 660
 ATCGAGGTTT CAGCCAGAGA ACACAAAGAA GCGCACGTTT GTGGCAGCCG ACGGAAGTC
 TAGCTCCAA GTCGGTCTCT TGTGTTTCTT CGCGTGCAAA CACCGTCGGC TGCTTTTCAG
 670 680 690 700 710 720
 CTACCAAGTG CCCATGCTGG CCCAGCTCTC CGTGTTCCGG TGTGGGTCTA CGAGCACCCC
 GATGGTTTAC GGGTACGACC GGGTCGAGAG GCACAGGGCC ACACCCAGAT GCTCGTGGGG
 730 740 750 760 770 780
 CAGTGACTTA TGGTACAACT TCATCGAGCT GCCCTACCAC GGGGAAGGCA TCAGCATGCT
 GTCAGTGAT ACCATGTTGA AGTAGCTCGA CGGGATGGTG CCCCTTTCGT AGTCGTACGA
 790 800 810 820 830 840
 GATCGCGCTG CCCACGGAGA GCTCCACCCC CCTCTCAGCC ATCATCCCTC ACATCAGCAC
 CTAGCGCGAC GGGTGCCTCT CGAGGTGGGG GGAGAGTCGG TAGTAGGGAG TGTAGTCGTG
 850 860 870 880 890 900
 CAAGACCAT GACAGCTGGA TGAGCACCAT GGTGCCCAAG AGAGTGCAAG TCATCCTGCC
 GTTCTGGTAT CTGTCGACCT ACTCGTGGTA CCACGGGTTT TCTCACGTCC AGTAGGACGG

910	920	930	940	950	960
CAAGTTCACA	GCTGTAGCAC	AAACAGATTT	GAAGGAGCCC	CTGAAGGTTT	TTGGCGTCAC
GTTCAAGTGT	CGACATCGTG	TTTGTCTAAA	CTTCCTCGGG	GACTTCCAA	AACCGCAGTG
970	980	990	1000	1010	1020
CGAGATGTTT	GATCCATCAA	AGGCAATTT	TGCAAAAATA	ACAAGATCAG	AAACCTTCA
GCTCTACAAA	CTAGGTAGTT	TCCGTTTAAA	ACGTTTTTAT	TGTTCTAGTC	TTTTGGAGT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TGTTTCTCAC	ATCTTGCAAA	AAGCGAAAT	TGAAGTCAGC	GAAGACGGAA	CGAAGCTTC
ACAAAGAGTG	TAGACGTTT	TTGCTTTTA	ACTTCAGTCG	CTTCTGCCTT	GCTTTCGAAG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGCAGCAACA	ACTGCGATT	TGATTGCAAG	GTCGTCGCCT	CCCTGGTTTA	TAGTAGACAG
GCGTCGTTGT	TGACGCTAAG	ACTAACGTT	CAGCAGCGGA	GGGACCAAT	ATCATCTGTC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ACCTTTTCTA	TTTTTCATCC	GACATAATCC	TACAGGTGCT	GTTTTATTCA	TGGGGCAGAT
TGGAAAAGAT	AAAAGTAGG	CTGTATTAGG	ATGTCCACGA	CAAAATAAGT	ACCCCGTCTA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
AAACAAACCC	TGAAGAGTAA	AGCAAAAGGA	ACCATGCATA	GAAAGAGCTC	CTTTGCTCAG
TTTGTTTGGG	ACTTCTCATT	TCGTTTTCTT	TGGTACGTTT	CTTTTCTGAG	GAAACGAGTC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAGAAAAGAC	TCTTTCCAC	GTCTTTCATA	GTTCTGTTCA	ATATTTTTGT	ACGTTACTTT
TTCTTTTCTG	AGAAGGGTG	CAGAAAGTAT	CAGACACAGT	TATAAAAACA	TGCAATGAAR
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CTTTTTCATA	ACTAGGTCTT	AGGAACAGAG	ATGAGTGATG	CAGCATTTCT	ATTCTGGGAG
GAAAAGTTT	TGATCCAGAA	TCCTTGCTC	TACTCACTAC	GTCGTAAAGA	TAAGACCCTC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GTATTAAAGG	GGAAAGGGGG	CAGGATGGCC	AGAACACTGT	ACTGAAGAA	GAATAGAAAG
CATAATTCCC	CCTTTCCCCC	GTCCTACCGG	TCTTGTGACA	TGACTTCTTA	CTTATCTTTC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCTTCAAAAT	GTCTAAGAGA	TTCTTTAATC	TACTGAGTGG	TTTCCTAGGT	TAACAGCCCT
CGAAGTTTTA	CAGATTCTCT	AAGAAATTTG	ATGACTCACC	AAAGGATCCA	ATTGTCGGGA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CTTGAGTATT	TCCTGTCCAG	TTCAAGGAGT	CTGTTTTGTT	TTGTTTCTAT	GTGTGGCTTT
GAACTCATAA	AGGACAGGTC	AAGTCCTCAA	GACAAACAAA	AACAAGATA	CACACCGAAA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TCAGAAAAAA	AAATTTTAAT	CAGTGTGATT	TGGGGAAAAA	AATAAGGACA	TTTTATGGTA
AGTCTTTTTT	TTTAAATTA	GTCACACTAA	ACCCCTTTTT	TTATTCCTGT	AAATACCAT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GCGTTTACTT	TTTTATGAAA	AAGGTATTAT	TGGCCTTTTA	ATTTTTTTTT	TTTTTTTTTT
CGCAATGAA	AAAATACTTT	TTCCATAATA	ACCGGAAAT	TTAAAAAAA	AAAAAAA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GGTCTCATCC	AAAGTCTTGA	TAGTAAGCCT	TATTTTGGGG	GTAGAAATAG	CAAAATCTCT
CCAGAGTAGG	TTTCAGAACT	ATCATTCCGA	ATAAAACCCC	CATCTTTATC	GTTTTAGAGA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
AGCCTCTTTG	TGTGTTTTTT	GTTGTTGTTG	TTTTATATAA	TGCATGTATT	CACTAAATA
TGGAGAAAC	ACACAAAAA	CAACACACAC	AAATATATT	ACGTACATAA	GTGATTTTAT

1810	1820	1830	1840	1850	1860
AAGTTTAAA	AACTAATGTC	TTGCTAGACA	AGGTTTGCTG	TTGTGCAGTG	TGCCTGTCAC
TTCAATTTT	TTGATTACAG	AACGATCTGT	TCCAAACGAC	AACACGTCAC	ACGGACAGTG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TACTGGTCTG	TACTCTCTGG	ATTTGCATTT	TTGTTATTTT	GTACAAAGTA	AAAATAAAGT
ATGACCAGAC	ATGAGAGACC	TAAACGTAAA	AACAATAAAA	CATGTTTCAT	TTTTATTTC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GTTATGAGTA	GTTAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAA..... -3'
CAATACTCAT	CAATTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTT..... -5'

queue poly(A)+

il a été possible de déduire la séquence en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine codée par le gène *PN1* porcin. Cette séquence est représentée à la figure 16.

3.2.3 Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène *PN1* chez les autres espèces

La séquence codante du gène *PN1* porcin a été soumise à une comparaison avec l'ensemble des séquences disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). La figure 17 fait état des séquences de gènes qui ont un fort pourcentage de similarité avec la séquence codante porcine. Dans la liste, on retrouve entre autres le gène de l'inhibiteur de la protéase sérine (*SERPINE 2*) bovin (*Bos taurus*) et humain (*Homo sapiens*), le gène de la Nexin (*GLIA-DERIVED NEXIN*) humain et de rat (*Rattus norvegicus*) et le gène de l'inhibiteur 1 du plasminogène activé (*Plasminogen-activated-inhibitor 1*) de souris (*Mus musculus*), humain et bovin. La table VII montre une comparaison entre la séquence codante du gène *PN1* porcin et les séquences codantes des gènes qui s'apparentent le plus au gène *PN1* chez les autres espèces. La séquence codante de *PN1* porcin (*Sus scrofa*) possède de très hauts pourcentages de similarité avec les gènes *GLIA-DERIVED NEXIN* chez l'humain (*Homo sapiens*)(88,9%) et chez le rat (*Rattus norvegicus*)(83,1%), avec le gène *SERPINE 2* chez le bovin (*Bos taurus*)(90,7%) et avec le gène *Plasminogen-activated-inhibitor 1* chez la souris (*Mus musculus*)(83,4%). Par rapport au gène *GLIA-DERIVED NEXIN* chez l'humain, la séquence codante du gène *PN1* porcin (88,9%) est un peu plus similaire que la séquence codante du gène *Plasminogen-activated-inhibitor 1* chez la souris (84%).

3.2.4 Comparaison entre les séquences en acides aminés du gène *PN1* chez le porc, l'humain, le bovin, la souris et le rat

La table VIII démontre la comparaison entre les séquences en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine et les séquences en acides aminés des protéines qui s'apparentent le plus à la protéine NEXIN-1 chez les autres espèces de mammifères. Les séquences en acides

Figure 16. Séquence en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine déduite de la séquence codante du gène *PNI* porcin.

10	20	30	40	50	60
MNWHFPFFLV	ATVTLPSVCS	QFNPLSLEEL	GSDTGIQVFN	QIVKSAPHDN	IVISPHGIAS
70	80	90	100	110	120
VLGMLQLGAD	GRTKKQLTTY	MRYGVNGVGK	VLKKINKAIV	SKKNKDIYTV	ANAVFVKNGF
130	140	150	160	170	180
KMEVPFVTRN	KDVFQCEVRN	ADFEDPASAC	DSINLWVRNE	TRGMIDSLLS	POLLDVLTTR
190	200	210	220	230	240
LVLVNAVYFK	GLWKSARFQE	NTKKRTFVAA	DGKSYQVPML	AQLSVFRCGS	TSTPSDLWYN
250	260	270	280	290	300
FIELPYHGES	ISMLIALPTE	SSTPLSAIIP	HISTKTIDSW	MSTMVPKRVQ	VILPKFTAYR
310	320	330	340	350	360
QTDLKEPLKV	LGVTEMFOPS	KANFAKITRS	ENLHVSHILQ	KAKIEVSEDG	TKASRATTAI
370	380	390	400	410	420
LIARSSPPWF	IVDRPFLFFI	RHNPTGAVLF	MGQINKP*..

Figure 17. Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène *PN1* porcin (*Sus scrofa nexin-1(PN1) mRNA...*) suite à une recherche effectuée dans le moteur de recherche BLAST offert par le site internet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gil28435506 gb AY059415.3 Sus scrofa nexin-1 (PN1) mRNA, ...	<u>2361</u>	0.0
gil27807206 reflNM_174669.1 Bos taurus serine (or cysteine...	<u>1489</u>	0.0
gil23506939 gb AF251153.1 Bos taurus serine protease inhib...	<u>1489</u>	0.0
gil27769055 gb BC042628.1 Homo sapiens, similar to serine	<u>1314</u>	0.0
gil183063 gb M17783.1 HUMGDN Human glia-derived nexin (GDN)...	<u>1308</u>	0.0
gil24307906 reflNM_006216.1 Homo sapiens serine (or cystei...	<u>1292</u>	0.0
gil15990530 gb BC015663.1 BC015663 Homo sapiens, Similar to...	<u>1292</u>	0.0
gil14715028 gb BC010675.1 Mus musculus, serine (or cystein...	<u>803</u>	0.0
gil6678098 reflNM_009255.1 Mus musculus serine (or cystein...	<u>795</u>	0.0
gil551064 emblX70296.1 MMPN1A M.musculus PN-1 mRNA for prot...	<u>795</u>	0.0
gil26341885 dbj AK051332.1 Mus musculus 12 days embryo spi...	<u>795</u>	0.0
gil26339009 dbj AK047856.1 Mus musculus 16 days embryo hea...	<u>795</u>	0.0
gil26337720 dbj AK045954.1 Mus musculus adult male corpora...	<u>795</u>	0.0
gil6708303 gb AF210380.1 AF210380 Bos taurus nexin mRNA, pa...	<u>720</u>	0.0
gil27685446 reflXM_217453.1 Rattus norvegicus serine (or c...	<u>527</u>	e-146
gil204283 gb M17784.1 RATGDN Rat glia-derived nexin (GDN) m...	<u>515</u>	e-143

Table VII. Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène *PN1* chez différentes espèces de mammifères. Les séquences homologues ont été comparées à partir du codon du début de la transcription (ATG) jusqu'au codon de terminaison.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa <i>PN-1</i> (AY059415)	Homo sapiens <i>PN-1</i> (BC042628)	Bos taurus <i>SERPINE 2</i> (NM_174669)	Mus musculus <i>Plasminogen- activated- inhibitor 1</i> (BCO10675)	Rattus norvegicus <i>Serpine 2</i> (XM_217453)
Sus scrofa <i>PN-1</i> (AY059415)	100%				
Homo sapiens <i>PN-1</i> (BC042628)	88.9%	100%			
Bos taurus <i>SERPINE 2</i> (NM_174669)	90.7%	88.2%	100%		
Mus musculus <i>Plasminogen-activated- inhibitor 1</i> (BCO10675)	83.4%	84%	83.4%	100%	
Rattus norvegicus <i>Serpine 2</i> (XM_217453)	83.1%	83.1%	83.3%	92.4%	100%

Table VIII. Pourcentages de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine NEXIN-1 qui découlent de la séquence codante du gène *PN1* chez différentes espèces de mammifères.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa NEXIN-1 (AY059415)	Homo sapiens NEXIN-1 (BC042628)	Bos taurus SERPINE 2 (NM_174669)	Mus musculus Plasminogen- activated- inhibitor 1 (BCO10675)	Rattus norvegicus Serpine 2 (XM_217453)
Sus scrofa NEXIN-1 (AY059415)	100%				
Homo sapiens NEXIN-1 (BC042628)	92.9%	100%			
Bos taurus SERPINE 2 (NM_174669)	94.7%	91.7%	100%		
Mus musculus Plasminogen- activated- inhibitor 1 (BCO10675)	87.2%	85.1%	83.9%	100%	
Rattus norvegicus Serpine 2 (XM_217453)	86.2%	83.9%	83.2%	92.5%	100%

aminées sont déduites des séquences codantes disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). La séquence en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine démontre un fort pourcentage de similarité avec les protéines codées par les gènes *GLIA-DERIVED NEXIN* chez l'humain (*Homo sapiens*)(92,9%) et chez le rat (*Rattus norvegicus*)(86,2%), par le gène *SERPINE 2* chez le bovin (*Bos taurus*)(94,7%) et par le gène *Plaminogen-activated-inhibitor 1* chez la souris (*Mus musculus*)(87,2%). Une fois de plus, la séquence porcine en acides aminés est plus similaire (92,9%) à la séquence en acides aminés humaine, que la séquence murine (85,1%).

3.2.5 Stratégies de clonage des séquences génomiques 5' du gène *PN1* porcin

La figure 18 illustre la stratégie qui a permis de cloner 3,4kb de séquences promotrices en amont du codon d'initiation de la transcription pour le gène *PN1* porcin. À partir des quatre mini-librairies d'ADN génomique porcine non-clonées effectuées à l'aide de la technologie du «Universal Genome Walker kit» (Clontech), deux séries de criblage par PCR ont été nécessaires afin d'obtenir une séquence promotrice de la taille de 3,5kb. Lors d'un premier criblage des mini-librairies, un fragment de 500pb a été amplifié à partir de la mini-librairie digérée par l'enzyme PvuII à l'aide de l'amorce commerciale AP2 (Clontech) et de l'amorce spécifique antisens pNEX.8. La séquence de ce fragment a été utilisée pour synthétiser des amorces utilisées dans une deuxième ronde de criblage des quatre mini-librairies porcines afin d'obtenir plus de séquences génomiques en 5'. Suite au deuxième criblage, un fragment de 3kb a été amplifié à partir de la mini-librairie digérée par l'enzyme EcoRV avec l'amorce commerciale AP2 (Clontech) et l'amorce spécifique antisens p5'Nex.2.

3.2.6 Séquence de 3,4kb de la région promotrice du gène *PN1* porcin

La séquence de 3,4kb de la région promotrice du gène *PN1* porcin ainsi que la localisation et la direction des différentes amorces utilisées pour l'amplification et le

Figure 18. Illustration de la stratégie qui a permis le clonage de 3,4kb de séquence 5'flanquante du gène *PN1* porcin.

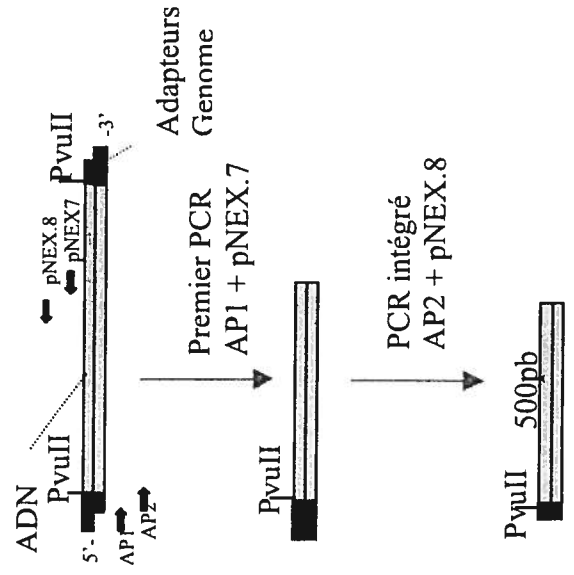
Création de mini-librairies d'ADN génomique porcine non-cloné "Universal Genome Walker" (CLONTECH)

- Digestion ADN génomique porcin avec enzymes qui laissent des extrémités franches
- Ligation avec adaptateurs "Genome Walker"

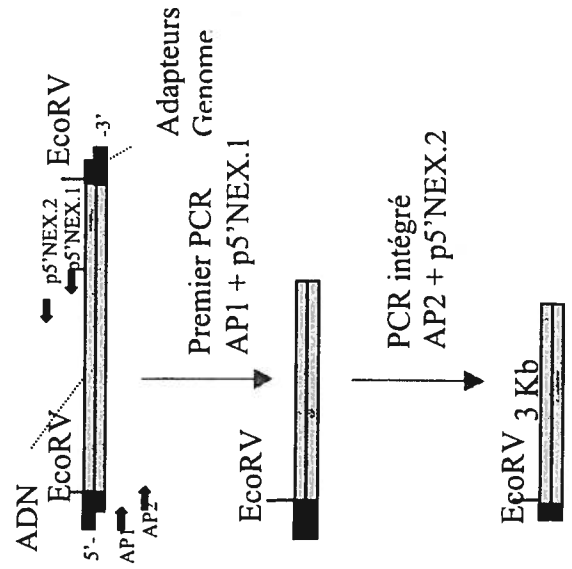
4 Mini-librairies

DraI
PvuII
EcoRV
StuI

1er criblage (librairie PvuII)



2ème criblage (librairie EcoRV)



séquençage sont représentées à la figure 19. La séquence promotrice est directement en amont du codon d'initiation de la transcription (ATG) situé à la position nucléotidique 3426.

3.2.7 Comparaison des séquences promotrices du gène *PN1* chez le porc, l'humain et la souris

Les séquences promotrices du gène *PN1* porcin et murin ont été comparées par rapport à la séquence promotrice du gène *PN1* humain. La figure 20 illustre cette comparaison. Les séquences promotrices humaine et murine sont disponibles dans la banque de données ([//genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)) grâce aux grands projets de séquençage du génome. Des gros blocs d'homologie d'au moins 60% ont été recherchés entre les trois séquences promotrices sur une distance de -3,4kb à partir du codon d'initiation de la transcription. Suite à cette analyse, 5 blocs d'homologie entre la séquence porcine et la séquence humaine ont été retrouvés. Les pourcentages de similarité de ces blocs se situent entre 63,4% et 68,1% et leur taille varient de 73pb à 1346pb. Entre la séquence murine et la séquence humaine, 7 blocs d'homologie ont été découverts. Leur pourcentage de similarité s'étend de 61,1% à 67,3%. Par contre, la taille de ces blocs est relativement plus petite que dans le premier cas. Ils se situent entre 178 pb et 589pb. Dans les deux cas, l'ordre des blocs est conservé, même s'ils ne sont pas à la même position.

3.2.8 Recherche de sites potentiels de liaison de facteurs de transcription

À l'aide de données retrouvées dans la littérature, les séquences de site consensus des facteurs SRY, SOX9, Lhx9, WT1, SF1 et GATA ont été recherché sur les promoteurs *PN-1* porcin, humain et murin. La figure 21 fait état des sites potentiels de liaison répertoriés sur les promoteurs *PN-1* porcin, humain, et murin.

Figure 19. Séquence de 3,4kb de région promotrice du gène *PN1* porcin directement en amont du codon du début de la transcription (ATG). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de ce fragment sont soulignées. Une flèche orientée → indique que c'est une amorce sens, alors qu'une flèche orientée ← indique que c'est une amorce antisens.

p5'NEX.F →

XhoI/p5'NEX.G

10	20	30	40	50	60
ATCAGCGAAA	GAACATAGGG	ATCACACCCA	CTCTTCTGGC	TACTGAAGTT	TGGCGAGAAG
TAGTCGCTTT	CTTGTATCCC	TAGTGTGGGT	GAGAAGACCG	ATGACTTGAA	ACCGCTCTTC

→

70	80	90	100	110	120
TAAAGCTTC	GTCTTAGCCA	GGTGAGTTTA	GACGACTAAG	CATTGAGCCG	AGGAAGCTTT
ATTTTCGAAG	CAGAATCGGT	CCACTCAAT	CTGCTGATTC	GTAAGTCGGC	TCCTTTGAAG

130	140	150	160	170	180
GAGGCCAAGA	AGAAGTTATG	CCCAGAACAT	CAATCAAAAA	TAGCTCTGAT	TCCAGTTTCT
CTCCGGTTCT	TCTTCAATAC	GGGTCTTGTA	GTTAGTTTTT	ATCGAGACTA	AGGTTCAAGA

190	200	210	220	230	240
CCACAGCCCG	GACACTGTCC	CAGTGCCTG	TTACGAAGCT	ACACACAGAC	ATCTCTCAGA
GGTGTGCGGC	CTGTGACAGG	GTCACGTGAC	AATGCTTTGA	TGTGTGTCTG	TAGAGAGTCT

250	260	270	280	290	300
AACATCCAC	ATCCAGGGA	CCAGAAAAA	CACCCATGGA	AGCCTTTCTC	CACTTTATAA
TTGTAGGGTG	TAGGTTCCCT	GGTTCTTTTT	GTGGGTACCT	TCGGAAGAG	GTGAATATT

310	320	330	340	350	360
TGAACCGTT	CTTTTAGCAA	AACTCACAA	CCAGCAAAA	GCCTGCTAAA	TAAGGTGGCT
ACTTTGGCAA	GAAATCGTT	TTTGAGTGT	GGTTCGTTTT	CGGACGATTT	ATTCCACCGA

p5'NEX.B →

370	380	390	400	410	420
CTTGATTTGG	GAGACAGTCT	TCGCTGAGTC	CAAGACCTCG	GAGCTGTCAC	CTTTCTCGCA
GAACATAACC	CTCTGTCAGA	AGCGACTCAG	GTTCTGGAGC	CTCGACAGTG	GAAAGAGCGT

430	440	450	460	470	480
TCACCGACCC	TTTCTACCTG	CCGTTCCATA	AAGAGTATTT	GGGTGAGTCA	CCTTTTAAC
AGTGGCTGGG	AAGATGGAC	GGCAGGTAT	TTCTCATAAA	CCCACTCAGT	GGAAATTTG

490	500	510	520	530	540
TATCAGAGGC	AAAACCAATT	TGATGTCCCT	TATGAGTATG	CAGATGCAAA	TATTTATTCA
ATAGTCTCCG	TTTTGGTTAA	ACTACAGGAA	ATACTCATAC	GTCTACGTTT	ATAAATAAGT

550	560	570	580	590	600
AATATTTGCT	GATCCAGGAG	GATTACTTGG	GGAGTATAAA	TGACGCATG	CTGAAGGCAG
TTATAACGA	CTAGGTCCTC	CTAATGAACC	CCTCATATTT	ACTGCTGTAC	GACTTCCGTC

610	620	630	640	650	660
ATGCTAGART	CCACTGTAAC	GCGAGTCCAC	AGTTCAGACT	GATGAAGTTG	GCGCCCATCA
TACGATCTTA	GGTGACATTG	CGCTCAGGTG	TCAAGTCTGA	CTACTTCAAC	CGCGGGTAGT

p5'NEX.C →

670	680	690	700	710	720
CCAGACTTGG	CCATTTGTCA	CAAGACACT	ATAAACTGTT	TTATACCTAT	GATAGCTCTG
GGTCTGAACC	GGTAACAGT	GTTNCTGTGA	TATTTGACAA	AATATGGATA	CTATCGAGAC

730	740	750	760	770	780
TAGTATATTA	GATTTTAAAG	GGAAATGTAT	TTCCAGAAAG	AAATAAGGGG	GAGGGAGAGG
ATCATATAAT	CTAAATTTCT	CCTTTACATA	AAGGTCTTTC	TTTATTCCCC	CTCCCTCTCC

790	800	810	820	830	840
GTGCGGACTC	AATGTCTAAT	TTTLAGATGA	CATGAGTAAA	GCTTCCATAG	TCAGGATTTG
CACGCCTGAG	TTACAGATTA	AAATCTACT	GTAATCATTT	CGAAGGTATC	AGTCTTAAC

850	860	870	880	890	900
AGAGCCCATC	AATGTCCAAC	AGGCTGAAAA	AAACTCAGGA	GATTGTTGTG	GATAGAGAGC
TCTCGGGTAG	TTACAGGTTG	TCCGACTTTT	TTTGAGTCTT	CTAACACAC	CATACTCTCG

910	920	930	940	950	960
CAGTCCAGG	TGCCAAGTC	AAAAGAGGCC	ACACTGGCCA	TAGGAAGCC	TCACTTGGG
GTCAGGTTCC	ACGGTTTCAG	TTTTCTCCG	TGTGACCGT	ATCCTTTCGG	AGTTGAACCC
				p5'NEX.D →	
970	980	990	1000	1010	1020
AGCTTTATGT	AGGTCACCTA	CATGCTTTGA	ATTTAGACAG	GCTGCATTTA	CACAGTTGTA
TCGAATACA	TCCAGTGAAT	GTACGAACCT	TAAATCTGTC	CGACGTAAAT	GTGTCAACAT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TTACAGTTAA	TCTCTGGATA	AACTCTGAAT	GTTCTAATT	TTTTATATTG	TGCTTGTTTC
AATGTCAATT	AGAGACCTAT	TTGAGACTTA	CAGATTTAA	AAATATAAC	ACGACCAAG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
ACAATATATG	AGATAGTTGC	AACATCACCT	TGATGATGG	CCTTAGAGGT	TCATCTTTAA
TGTTATATAC	TCTATCAACG	TTGTAGTGGA	ACTTACTACC	GGATCTCCA	AGTAGAATT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GTGTTTTGGT	GGGGAGCAGG	TGGGAACAG	CCTCTGAGA	CAGCCTTCTC	CCAAACCCAG
CACAAACCA	CCCCTCGTCC	ACCCTTTGTC	GGAGACTTCT	GTCGGAGAG	GGTTTGGGTC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TGCATTTTAC	CCTCCTTGGG	AAGTGTGTTG	CACTAACAGT	GAGCAAGGCT	CAGGACTGNA
ACGTAAAGTG	GGAGGAACCC	TTCAACAACC	GTGATTGTCA	CTCGTTCCGA	GTCCTGACNT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CAGAACCATG	TCCTTAGTCA	CGCTCAGTAA	ACATTGTGGA	GCTCCCATTG	TGGCTCAGNG
GTCTTGGTAC	AGGATCAGT	GCGAGTCATT	TGTAAACACCT	CGAGGGTAAC	ACCGAGTCNC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GTAATGAACC	CGACTAGTAT	CCGCAAGGAC	ACAGTTTCCA	TCCCTAACCT	CACTCAGTGG
CATTACTTGG	GCTGATCATA	GGCGTTCCTG	TGTTCAAGCT	AGGGATTGGA	GTGAGTCACC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GTTAAGGATC	CAGCATTGCC	ATGAGCTGCA	GTGTAGTCGC	AGACACAACT	CAGATCTGTC
CAATTCCTAG	GTCGTACCG	TACTCGACGT	CACATCAGCG	TCTGTGTTGA	GTCTAGACAG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ACTGCTGTGG	AAGCGGTGTA	GGCTGGCAGC	TGCAGCTCTG	ATTCAACCCC	TAGCCTGGGA
TGACGACACC	TTCCGCCACAT	CCGACCGTCG	ACGTCGAGAC	TAGTTTGGGG	ATCGGACCCCT
	p5'NEX.E →				
1510	1520	1530	1540	1550	1560
AACACCATAT	GCCITGGGTG	TGGCCGGCCC	TAAAAAGACT	ACACAAAAAA	CAAACAAAT
TTGTGGTATA	CGGAACCCAC	ACCGGCCGGG	ATTTTTCTGA	TGTGTTTTTT	GTTTGTTTTA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
ACATGATTAT	GATGCAATAA	AAAATAATCA	ACAAAAATAG	AAAGTATAGA	AGCCATCAGG
TGACTAATA	CTACGTTATT	TTTTATTAGT	TGTTTTTATC	TTTCATATCT	TGGTAGTCC
1630	1640	1650	1660	1670	1680
TTTAAATCCCA	CATGTGTTTC	ATGGACGTC	TACTGGGGTG	GGAGTAGGA	CAGTACGTA
AAATTAGGGT	GTACACAAAG	TACCTTGACG	ATGACCCAC	CCTTCATCCT	GTTTATGCAT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GAGAGGAAGG	CAAGGGAAAA	TGACCATGTG	CCAGTTCTGC	CCTGGTGTCC	TTTCCTTCCC
CTCTCCTTCC	GTTCCCTTTT	ACTGGTACAC	GGTCAGACG	GGACCACAGG	AAAGGAGGGG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGGAGCACTT	GGAGGTGTT	CCCCCTCTT	TCCAGGTCAC	CTGTCTTAAA	AGGCTGCCTT
ACCTCGTGAA	CCTCCACAA	GGGGGAGAA	AGGTCCAGTG	GACAGGATTT	TCCGACGGAA

1810	1820	1830	1840	1850	1860
CTTTCTTGTC	CTCCGCAGAC	ACCCCCAGCC	TCCCCCATGT	AAATGCGCAC	AGGACAGGAA
GAAAGAACAG	GAGGCGTCTG	TGGGGGTCGG	AGGGGGTACA	TTACGCGTG	TCCTGTCCTT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GACAAATTTT	AGGGGGGGAA	CTTGAGCTGA	CCAGTACAGC	GCCTGTCTAT	AAGGGAGGAG
CTGTTTAAAG	TCCCCCCTT	GAATCTGACT	GGTCATGTCG	CGGACAGATA	TTCCCTCCTC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
CCAAATTGCC	ACATCTTGAA	TTCTGCTTTT	GTTCTACCA	CTGCCGCTTC	TAAGTTCTTA
GGTTTAAACG	TGTAGAACTT	AAGACGAAAA	CAAGATGGTC	GACGGCGAAG	ATTCAAGAA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTTAATGAAA	GTATTTGCTT	TTCTACAAAC	ACATGTAAT	TTCCTACCCC	TTACTTGTCA
AAATTACTTT	CATAAACGAA	AAGATGTTTG	TGTACATTTA	AAGGATGGGG	AATGAACAGT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CAGCCAAAGA	GAGCCCACTA	AGCAGTCATC	AAGGAGAGAA	GCCTATTTCA	AACAATCAC
GTCGGTTTCT	CTCGGGTCAT	TCGTCAGTAG	TTCTTCTTT	CGGATAAAGT	TTGTTTAGTG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TATAATTGAG	AATTTCACTG	TAAACATGCG	CGTCGCCACG	ATTGATGAAC	TTGCCAATTG
ATATTAATCT	TTAAGTCAC	ATTTGTTACG	GCAGCGGTGC	TAATACTTGT	AACGGTTAAC
2170	2180	2190	2200	2210	2220
CTCTGCCCTC	TTGTAGATTT	AAGAGTGTCT	CTAAAATTTA	TTCTCATGAA	CAGTTCTTAA
GAGACGGGAG	AACATCTAAA	TTCTCACAGC	GATTTTAAAT	AAGAGTACTT	GTCAAGAAAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTAAGAGAGT	AATATGCTAG	AGTAAAAAAA	AAAAAAGTTG	NGTACCTGTA	GTGGAAGATA
AATTCTCTCA	TTATACGATC	TCATTTTTTT	TTTTTTCAC	NCATGGACAT	CACCTTCTAT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
ATCATACAC	CTCAAGGGAT	TCGATTCCCT	TGTTTCACAC	CCTCCAGTGG	GTTCTCAGAA
TAGTATTGTG	<u>GAGTCCCTA</u>	<u>AGCTAAGGGA</u>	ACAAAGTGTG	GGAGGTCACC	CAAGAGTTCT
	← p5'NEX.5				
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CCCTAGAAAT	AAATCCAAAA	GCCACACNTG	GCTTTACAGG	CCCTTCAGGA	ACTGGTCCCT
GGGATCTTAT	TTTAGGTTTT	CGGTGTGNAC	CGAAATGTCC	GGGAAGTCCT	TGACCAGGGA
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TCTTCTTCAC	CTCCTTTCTC	ACCTGTCCCC	TCNATGTCCC	TTACTTTGCA	GCTACATTGA
AGAAGAGAGT	GAGGAAGAG	TGGACAGGGG	AGNTACAGGG	AATGAACAGT	CGATGTAAT
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CTTCTGAGTG	TCCACCTCGG	TTCCCACCTC	AGGGCCGTTG	CCCAGCCACC	CCTCTGCTTG
GAAGACTCAC	AGGTGGAGCC	AAGGGTGGAG	TCCCGGCAC	GGGTCGGTGG	GGAGACGAAC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GCACACCCCT	CTTCCTGATC	AGGATACGGC	AGTCTTTCTC	ATCACTCAGG	TCTCAGCACA
CGTGTGGGAA	GAGGAGCTAG	TCCTATGCCG	TCAGAAAGAG	TAGTGAGTCC	AGAGTCGTGT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CCTGTCCCTC	TGCAGAGGTG	GCCCCGTGAC	TGTCTTATCT	AGCGGTGCGC	CACCCCTGGT
GGACAGGGAG	ACGTCTCCAC	CGGGGCACTG	ACAGGATAGA	TCGCCACGCG	GTGGGGACCA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CCTTCATTTA	CTCTCATCTC	TGTGCCTCAT	CGATGCTGAC	CCCTCTCTGA	GATGACCATA
GGAGGTAAAT	GAGAGTAGAG	ACACGGAGTA	GCTACGACTG	GGGAGAGACT	CTACTGGTAT

```

      2710      2720      2730      2740      2750      2760
TTGCTCCCTG GTTTATTTTC TGTCTCCCGT CTAGATATATC AGTTCCAAGA GGGCAAGGGT
AACGAGGGAC CAATAAAGAG ACAGAGGGCA GATCTTATAG TCAAGGTTCT CCCGTTCCCA

      2770      2780      2790      2800      2810      2820
CTTGGTCATC TTATTTACAG TTCTGTGCCC AGTCCTTAGG GCAGTARCCC CTTGGTAGAT
GAACCAGTAG AATAATGTC AAGACACGGG TCAGGAATCC CGTCATTGGG GAACCATCTA
                                     ← p5'NEX.3

      2830      2840      2850      2860      2870      2880
ACTAATGTAA CTGAATGAAG GATGGATACA AGAATGAART AACGATTAGA AGAGTGTCTG
TGATTACATT GACTTACTTC CTACCTATGT TCTTACTTTA TTGCTAATCT TCTCACAGAC

      2890      2900      2910      2920      2930      2940
GCAGAGGAGT TCCCATTGTG GTGCAGCAAC TAGTTCCCCT TGTGGTGAAT CCAACTAGTA
CGTCTCCTCA AGGGTACAC CACGTCGTTG ATCAAGGGGA ACACCACTTA GGTGATCAT
← p5'NEX.4

      2950      2960      2970      2980      2990      3000
ACCACGAGGT TGCAGGTTTG ATCCCTGGCC TCCGTCAGTG GGCTAAGGAT CCGACGTTGC
TGGTGCTCCA ACGTCCAAAC TAGGGACCGG AGGCAGTCAC CCGATTCCTA GGCTGCACCG

      3010      3020      3030      3040      3050      3060
CGTGAGCTGT GGTGTTGGTT GCAGATGCCG CTCAGATCTT GAGTGGCTGT GTCTGTGGCG
GCACTCGACA CCACRACCAA CGTCTACGCC GAGTCTAGAA CTCACCGACA CAGACACCGC

      3070      3080      3090      3100      3110      3120
TAGGCCGGCA GCTGCAGCTC CAATTCGACC CCTAGCTTGG AACCTCCAT ATGCCATGGG
ATCCGGCCGT CGACGTCGAG GTTAGCTGGG GGATCGAACC TTTGGAGGTA TACGGTACCC
                                     ← p5'NEX.2

      3130      3140      3150      3160      3170      3180
TGCAGCCCTA AAAAGCAAAA ATAAATAAAT TAAATAAAT AATTTAAGA TGAGTGTCTG
ACGTCGGGAT TTTTCGTTTT TATTTATTTA ATTTATTTTA TTAATTTCT ACTCACAGAC
                                     ←

      3190      3200      3210      3220      3230      3240
GCACAGAAAT GGGACCCAGC AAGTGGAGT TTCCTTCCTC TCTCTCCCTA TCCCCCTGAC
CGTGCTTAA CCCTGGGTCG TTCACTTCA AAGGAAGGAG AGAGAGGGAT AGGGGGACTG
p5'NEX.1

      3250      3260      3270      3280      3290      3300
ATAATATAGA GGAAGACAAAT TTAATCTACA CAGTTGTCTT GAATATATTA AAGACATTCT
TATTATATCT CCTTCTGTTA AATTAGATGT GTCAACAGAA CTTATATAAT TTCTGTAGA

      3310      3320      3330      3340      3350      3360
GTTAGAGTGT ATTAAATCAT ATCTAGCTGA GTACAAATA GCTCCCACCC CAAAGTGTT
CAATCTCACA TAATTTAGTA TAGATCGACT CATGTTTTAT CGAGGGTGCG GTTTTCACAA

      3370      3380      3390      3400      3410      3420
CATTTAGGTA GACTGTAAAT ATTTTCTGGA TCTCATTTCT CAGGTTGTCC TTGGTGGAG
GTAATCCAT CTGACATTTA TAAAGACCT AGAGTAAGA GTCCACACG ACCACCTTC
                                     ← SalI/p5'NEX.6

      3430      3440      3450      3460      3470      3480
GAACC ATG. .....
CTTGG TAC. .....

```

Figure 20. Comparaisons entre les séquences 5'flanquantes du gène *PN1* chez le porc, l'humain et la souris. Les blocs d'homologie sont représentés par des rectangles. La longueur en pb et le degré de similarité (%) sont indiqués juste au-dessus des rectangles. Les rectangles gris représentent la comparaison de l'homologie entre la séquence porcine et la séquence humaine. Les rectangles hachurés représentent la comparaison entre la séquence humaine et la séquence murine. Les lignes parallèles entre les espèces correspondent à la conservation d'un ou de plusieurs blocs d'homologie.

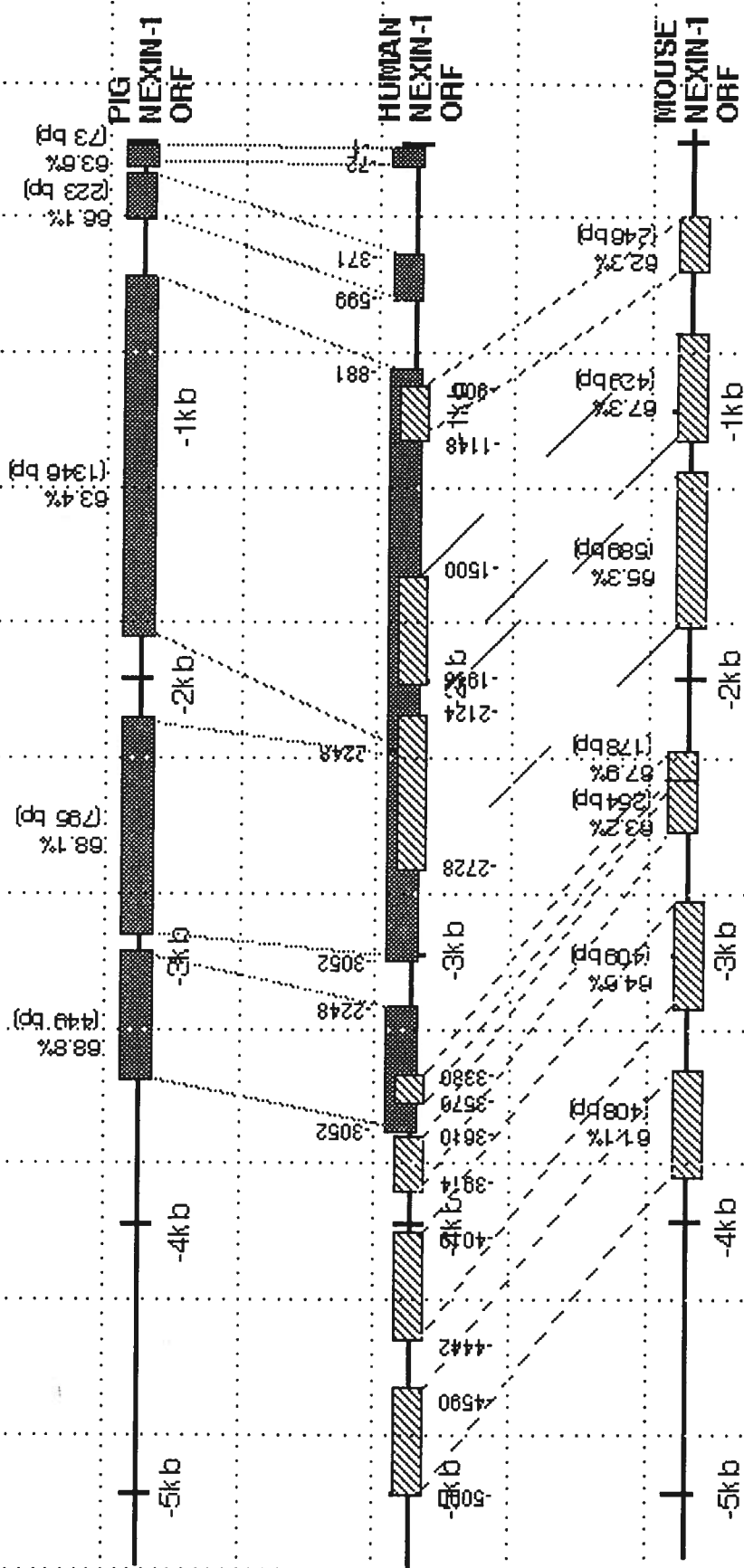
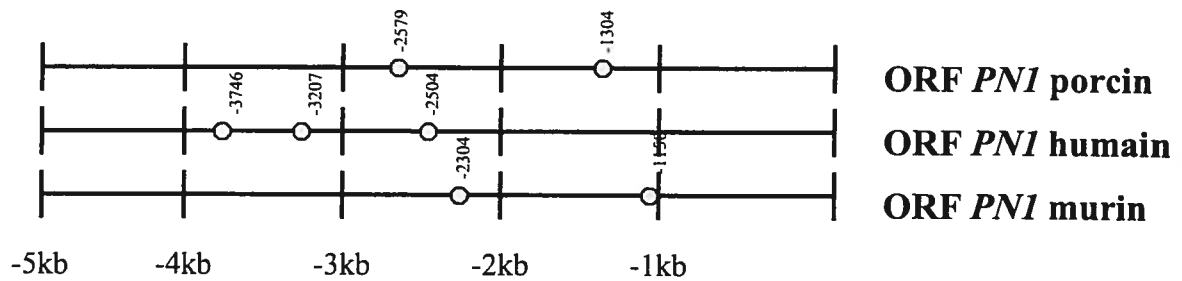
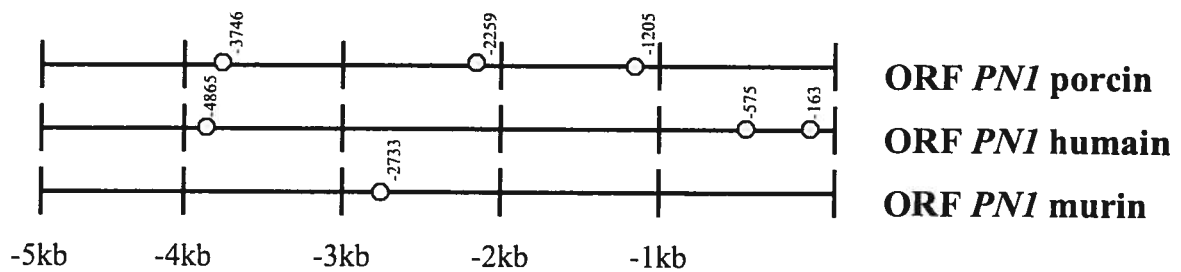
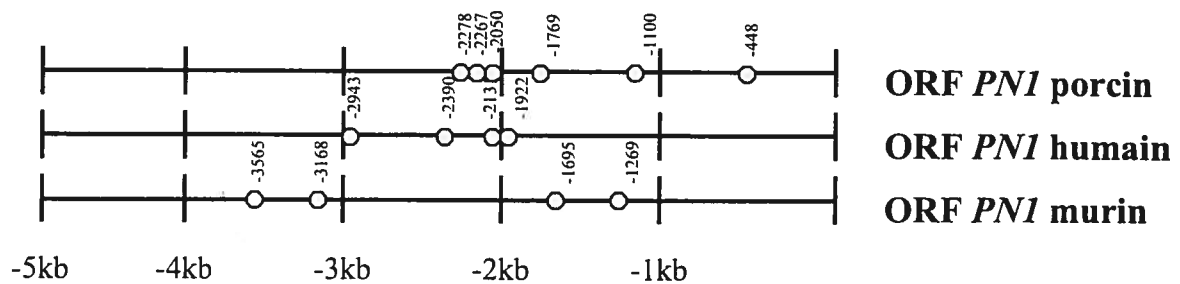


Figure 21. Sites de reconnaissance potentiels de facteurs de transcription impliqués lors de la détermination du sexe sur le promoteur du gène *PN1* chez différentes espèces.

○ = 1 site consensus

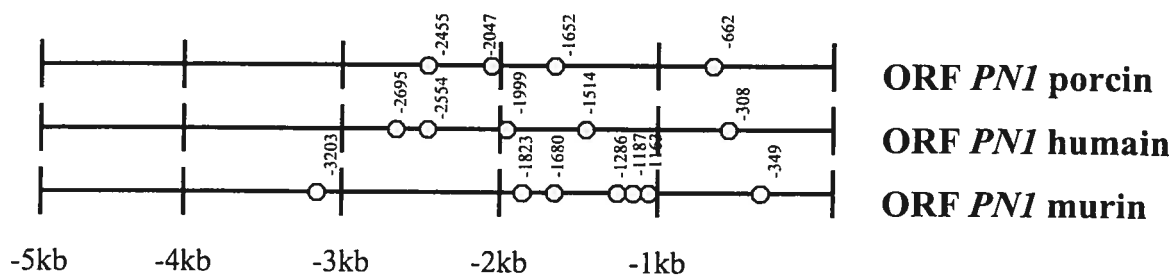
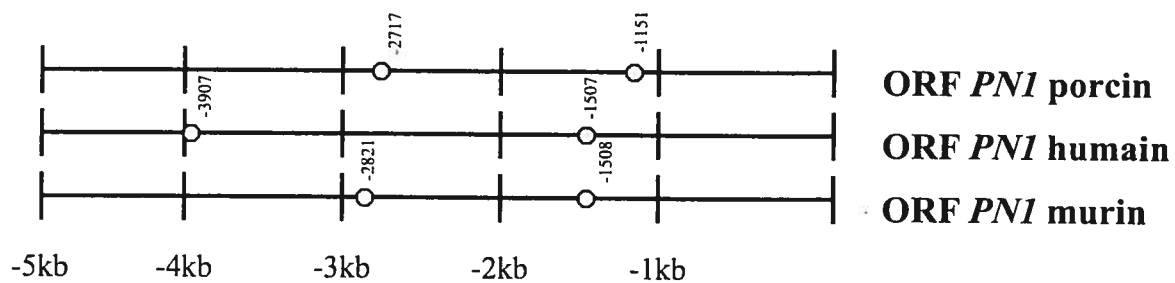
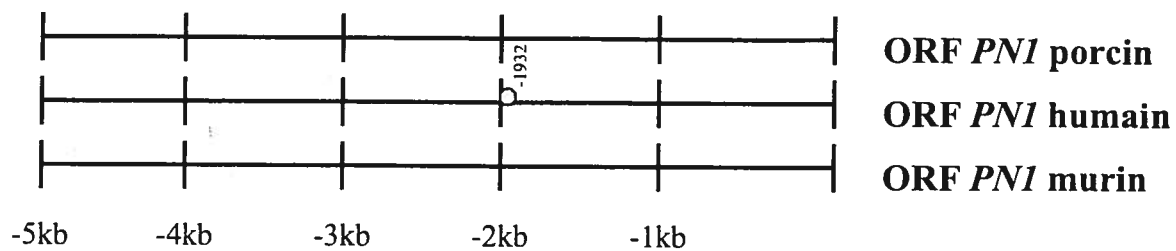
SRYséquence consensus: (a/t)(a/t)CAAA/tG (Nasrin *et al.*, 1991; Harley *et al.*, 1994)**SOX9**séquence consensus: GAACAATGG (Mertin *et al.*, 1999)**WT1**

séquence consensus: GTGGG (Hossain et Saunders, 2001)



SF1

séquence consensus: GGTc/tA (Parker et Schimmer, 1997)

**GATA**séquence consensus: (a/t)GATA(g/a) (Viger *et al.*, 1998)**Lhx9**séquence consensus: TAACAA (Wilhelm *et al.*, 2002)

3.2.9 Études de co-transfections du promoteur du gène *PN1* dans les cellules CV-1

Tout comme il a été fait pour le gène *VNN1* porcin, différents facteurs de transcription ont été testés afin de trouver si l'un d'eux pouvait avoir un effet direct sur le promoteur du gène *PN1* porcin. Parmi les facteurs étudiés (SRY porcin, Sox9 porcin, WT1 porcin, Sfl1 murin, Gata4 murin et Lhx9 murin), seulement le facteur Gata4 semblait avoir un effet direct sur le promoteur *PN1* porcin. La figure 22a montre l'effet transactivateur du facteur Gata4 murin sur l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur *PN1* porcin. Pour une quantité croissante de construction CMVp-GATA4murin, l'expression du vecteur rapporteur augmente. À une concentration de 100ng/puits de CMVp-GATA4 murin, l'expression est augmentée d'au moins 2 fois par rapport à l'expression du contrôle sans GATA4 murin. La figure 22b démontre que pour des concentrations croissantes, le facteur SOX9 porcin n'a aucun effet sur le promoteur *PN1* porcin. Par contre, lorsque le facteur SOX9 porcin est co-transfecté avec le facteur Gata4 murin, il semble capable d'annuler l'effet transactivateur du facteur Gata4 murin sur l'expression du promoteur *PN1* porcin (figure 22c).

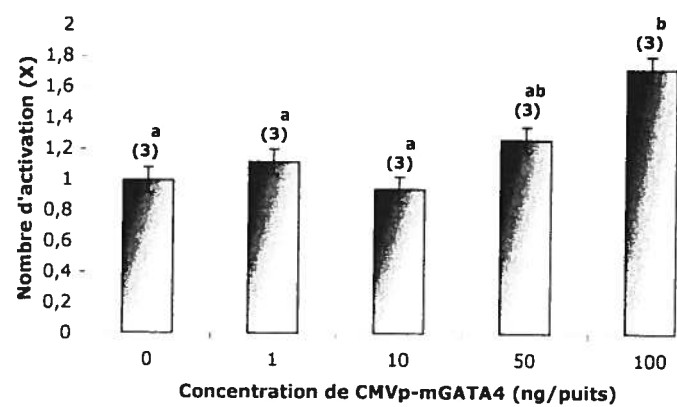
3.3 GÈNE *FGF9* PORCIN

3.3.1 Amplification de la séquence de l'ADNc du gène *FGF9* porcin

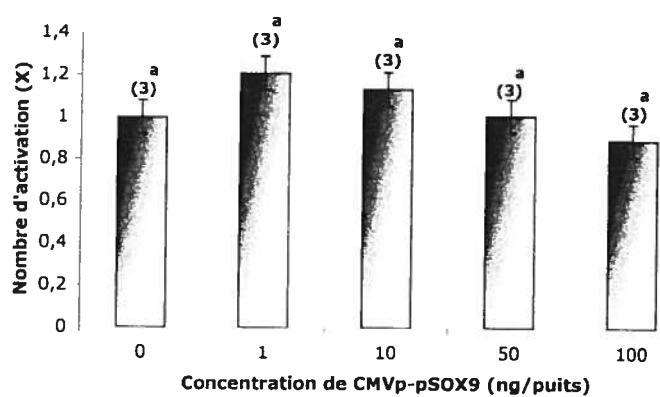
La stratégie de l'amplification de l'ADNc porcin du gène *FGF9* est illustrée à la figure 23. À partir de l'ARN poly(A)+ de rein de porc mâle adulte, une RT a été produite à l'aide de l'amorce hFGF9.1 (table IV, p.86). Suite à cette RT, un premier fragment d'ADNc de la taille de 667 pb a été amplifié par PCR avec les amorces hétérologues FGF9.B et FGF9.3 (table IV, p.86). Afin de produire la séquence de l'extrémité 3' de l'ADNc du gène *FGF9* porcin, l'amorce ADT7T17 qui reconnaît la queue poly(A)+ de l'ARNm a été

Figure 22. A) Effet de transactivation de la séquence porcine 5'flanquante du gène *PN1* par le facteur Gata4 murin. 50ng de la construction 3,5kb pPN1p-GFP a été co-transfecté avec différentes quantités (en ng/puits) de vecteur d'expression qui contient la séquence codante du facteur Gata4 murin sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,0048$. B) SOX9 porcine n'a aucun effet direct sur les séquences 5'flanquantes du gène *PN1* porcine. 50ng de la construction 3,4kb pPN1p-GFP a été co-transfecté avec différentes quantités (en ng/puits) de vecteur d'expression qui contient la séquence codante du facteur SOX9 porcine sous le contrôle d'un promoteur CMVp. Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,1174$. C) Effet inhibiteur du facteur SOX9 porcine sur la transactivation du promoteur *PN1* porcine exercée par le facteur Gata4 murin. Cette fois, 50 ng de la construction 3,4kb pPN1p-GFP a été co-transfecté avec 100 ng de facteur Gata4 murin (CMVp-mGATA4) et 100ng de facteur SOX9 porcine (CMVp-SOX9). Les données représentent les « least square means » \pm SEM; ANOVA : $P < 0,0103$. Les transfections transitoires ont été effectuées dans les cellules CV-1. La quantité totale d'ADN a été gardée constante en complétant avec le vecteur pBK-CMV sans insert. Pour l'analyse graphique, la fluorescence basale de la construction 3,4kb pPN1p-GFP seule a été déterminée à 1X. Les comparaisons multiples ont été effectuées par Tukey-Kramer $P < 0,05$.

A)



B)



C)

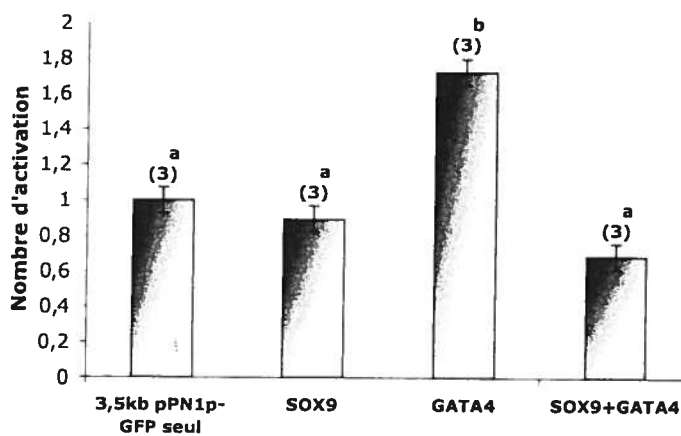
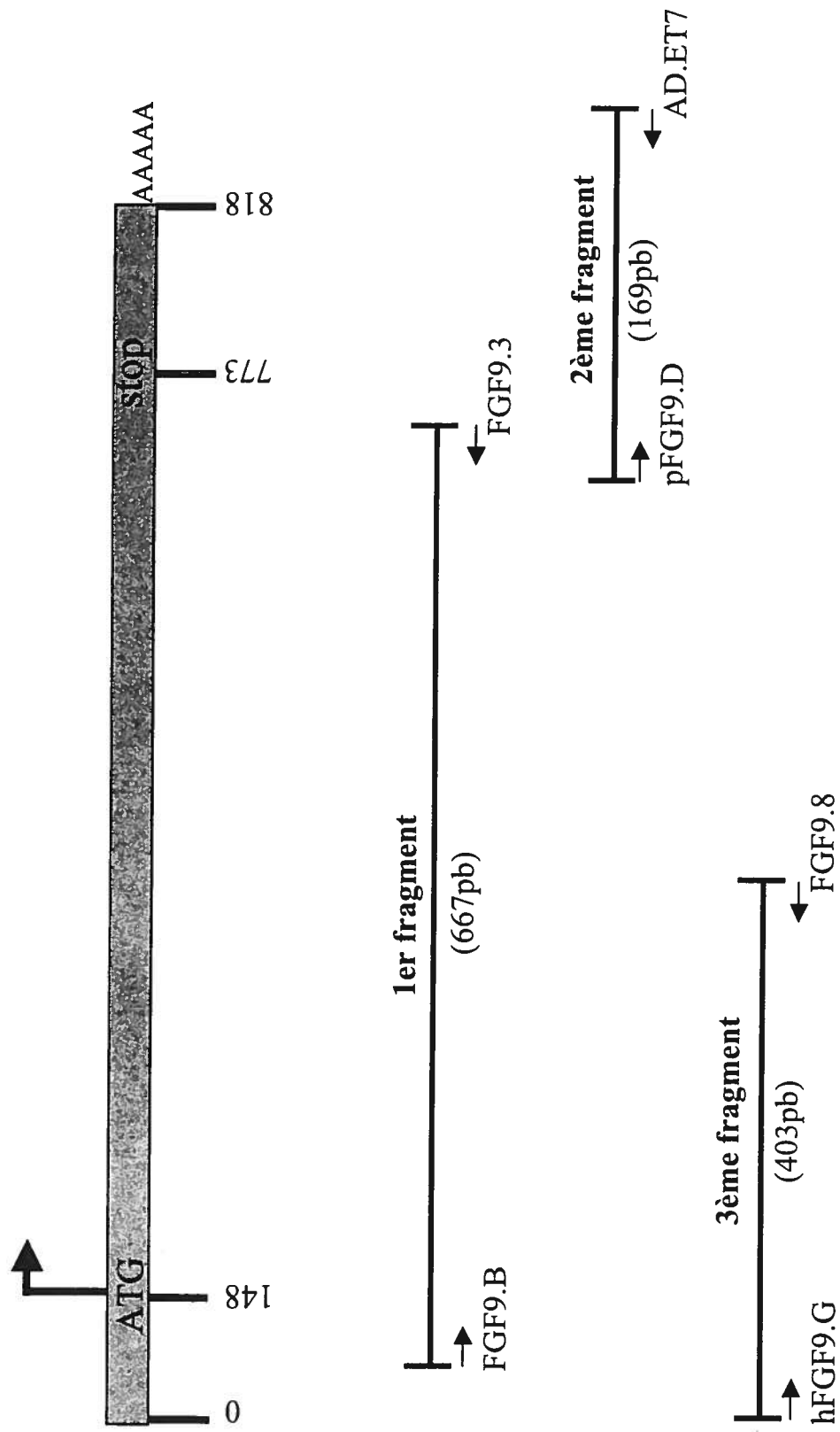


Figure 23. Résumé de la démarche utilisée pour le clonage complet de l'ADNc du gène *FGF9* porcin.



utilisée pour faire la RT. Les amorces pFGF9.D (table IV, p.86) et ADET7 (Table II, p.59) ont permis de produire un fragment de la taille de 169 pb. À partir de la séquence de l'ADNc du gène *FGF9* humain, une amorce a été synthétisée afin de pouvoir amplifier une portion de l'extrémité 5' non traduite de l'ADNc porcin. Les amorces hFGF9.G et pFGF9.8 (table IV, p.86) ont été utilisées pour cloner un fragment de 403pb directement à partir de l'ADN génomique de porc mâle. Le séquençage de ces trois fragments a permis d'obtenir la séquence partielle de l'ADNc du gène *FGF9* porcin.

3.3.2 Séquence partielle de l'ADNc du gène *FGF9* porcin

La séquence complète de l'ADNc du gène *FGF9* porcin ainsi que la localisation et la direction des différentes amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage sont représentées à la figure 24. Cette séquence de la taille de 843 pb a été soumise à la banque de données internet GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sous le numéro d'accès AY033825. Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 149 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 775. À partir de cette séquence, il a été possible de déduire la séquence en acides aminés de la protéine FGF9 porcine codée par le gène *FGF9* porcin. Cette séquence est représentée à la figure 25.

3.3.3 Recherche de séquences similaires à la séquence codante porcine du gène *FGF9* chez les autres espèces

La séquence codante du gène *FGF9* porcin a été soumise à une comparaison avec l'ensemble des séquences disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). La figure 26 fait état des séquences de gènes qui ont un fort pourcentage de similarité avec la séquence codante porcine. Parmi la liste, on retrouve les séquences du gène *FGF9* humain, murin et de rat. La séquence codante du gène *FGF9* est très bien conservée entre les espèces. La table 9 résume les données obtenues. La séquence codante porcine est similaire à la séquence humaine à 93,7%, à la séquence murine à 90,4% et à la séquence de rat à 91,5%. Lorsqu'on compare la séquence humaine

Figure 24. Séquence complète de la séquence codante du gène *FGF9* porcin. Les amorces utilisées pour le clonage et le séquençage du gène sont soulignées. Une flèche orientée → indique que c'est une amorce sens, alors qu'une flèche orientée ← indique que c'est une amorce antisens. Les deux premiers encadrés identifient le début et l'arrêt de la transcription de ce gène. Le dernier encadré met en évidence la queue poly(A)⁺ du transcrit.

FGF9.A →

10 20 30 40 50 60
 ATGCATTTAA TGGATTGAAG AAAAGGACCT TTTTCTCTCT CTCTGCAACT GCAGTAGGG
 TACGTAAATT ACCTAACTTC TTTTCTGGA AAAAAGAGA GAGACGTTGA CGTCATTCCC

FGF9.B →

70 80 90 100 110 120
 AGGGGAGTTG GATATACCTC GCCTAATATC TCCTGGGTTG GCACCATCAT TATTGTTTAT
 TCCCTCAAC CTATATGGAG CGGATTATAG AGGACCCAC CGTGGTAGTA ATAACAATA

DÉBUT

130 140 150 160 170 180
 CGCTGTGCTC CAAAAGCCGA GGCTTCTGAT GGCTCCCCTA GGTGAAGTTG GGAAGTATTT
 GCGACACGAG GTTTTCGGCT CCGAAGACTA CCGAGGGGAT CCACTTCAAC CCTTGATAAA

190 200 210 220 230 240
 CGGTGTGCA GATGCAGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCGGTGG ACAGCCCGGT
 GCCACACGTC CTACGTCATG GCRAACCCCT ACACGGGCAC AACGGCCACC TGTCCGGCCA

250 260 270 280 290 300
 TTTGTTAAGT GACCACCTGA GTCAGTCCGA AGCAGGGGGG CTTCCAGGG GACCCGCACT
 AAACAATTCA CTGGTGGACT CAGTCAGGCT TCGTCCCCC GAGGGTCCC CTGGGCGTCA

310 320 330 340 350 360
 CACGGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT CAGGCGGAGG CAGCTGTACT GCAGGACTGG
 GTGCCTGAAC CTAGTAATT TCCCTAGA GTCCGCCTCC GTCGACATGA CGTCCTGACC

370 380 390 400 410 420
 ATTTCACTTA GAATCTTCC CCAATGGTAC TATCCAGGGA ACCAGGAAG ACCACAGCCG
 TAAAGTGAAT CTTTAGAAGG GGTTACCATG ATAGGTCCCT TGGTCTTTC TGGTGTGGC

← FGF9.8

430 440 450 460 470 480
 CTTTGGCATC CTGGAATTCA TCAGTATAGC CGTGGGCTTG GTCAGCATTC GGGGCGTGG
 GAAACCGTAG GACCTTAGT AGTCATATCG GCACCCGAAC CAGTCGTAG CCCCACCT

490 500 510 520 530 540
 CAGCGGACTC TACCTGGGCA TGAACGAGAA GGGGGAGCTG TACGGATCCG AAAAATAAC
 GTCGCTGAG ATGGACCCGT ACTTGCTCTT CCCCCTCGAC ATGCCTAGGC TTTTGTATTG

550 560 570 580 590 600
 CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTTGA AGAAACTGG TATAACACGT ACTCCTCGAA
 GGTTCACACA CATAGTCTC TTGTCAACT TCTTTTGACC ATATTGTGCA TGAGGAGCTT

FGF9.C →

610 620 630 640 650 660
 TCTGTACAAA CACGTGGACA CTGGAAGCGG GTTCTATGTG GCGTTAACA AGGACGGGAC
 AGACATGTTT GTGCACCTGT GACCTTCCGC CAAGATACAC CGCAATTTGT TCCTGCCCTG

FGF9.D →

670 680 690 700 710 720
 CCCAGAGAA GGAACGAGGA CTAACGGCA CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC
 GGGGTCTCTT CCTTGCTCCT GATTGCCGT GGTCTTTAAG TGTGTAAAA ATGGATCTGG

← FGF9.3

730 740 750 760 770 780
 AGTGGACCCG GACAAAGTCC CCGAATAATA TAAGGATATT CTAGCCAAA GTTGAACAAG
 TCACCTGGC CTGTTTCAGG GGCTTGATAT ATCCTATAA GATTCGGTTT CACTGTTT

← FGF9.2

790 800 810 820 830 840
 ACTCTTCTT CACTTGAGCC CTTAAAAAG TAACCACTAA AAAAAAATA AAAAAAATA
 TGAGAAAGAA GTGAAGTCCG GAATTTTTC ATTGGTGATT TTTTTTTTT TTTTTTTTT

← FGF9.1

850 860 870 880 890 900
 AAA.....
 TTT.....

Figure 25. Séquence en acides aminés de la protéine FGF9 porcine déduite de la séquence codante du gène *FGF9* porcin.

10	20	30	40	50	60
MAPLGEVGNV	FGVQDAVPFG	NVPVLPVDSP	VLLSDHLSQS	EAGGLPRGPA	VTDLDHCLKGI
70	80	90	100	110	120
LARRQLYCRT	GFHLEIFPNG	TIQGTRKDHS	RFGILEFISI	AVGLYSIRGV	DSGLYLGME
130	140	150	160	170	180
KGELYGSEKL	TQECVFREQF	EENWYNTYSS	NLYKHVDTGR	RFYVALNKDG	TPREGTRTKR
190	200	210	220	230	240
HQKFTHFLPA	PVDPDKVPEL	YKDILSQS*

Figure 26. Liste des gènes qui possèdent une plus forte homologie avec la séquence codante du gène *FGF9* porcin (**Sus scrofa fibroblast growth factor 9 mRNA...**) suite à une recherche effectuée dans le moteur de recherche BLAST offert par le site internet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gil15487680 gb AY033825.2 Sus scrofa fibroblast growth fac...	<u>1243</u>	0.0
gil4503706 refl NM_002010.1 Homo sapiens fibroblast growth ...	<u>934</u>	0.0
gil391718 dbj D14838.1 HUMFGF Homo sapiens FGF-9 mRNA for f...	<u>934</u>	0.0
gil25742765 refl NM_012952.1 Rattus norvegicus fibroblast g...	<u>823</u>	0.0
gil391852 dbj D14839.1 RATFGF Rat mRNA for FGF-9, complete cds	<u>823</u>	0.0
gil1488391 gb S82023.1 S82023 fibroblast growth factor 9 [m...	<u>791</u>	0.0
gil1107458 dbj D38258.1 MUSFGF9 Mus musculus FGF9 mRNA for ...	<u>791</u>	0.0
gil7305056 refl NM_013518.1 Mus musculus fibroblast growth ...	<u>771</u>	0.0
gil1161346 gb U33535.1 MMU33535 Mus musculus fibroblast gro...	<u>771</u>	0.0

Table IX. Pourcentages de similarité existant entre les séquences codantes du gène *FGF9* chez différentes espèces de mammifères. Les séquences homologues ont été comparées à partir du codon du début de la transcription (ATG) jusqu'au codon de terminaison.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa <i>FGF9</i> (AY033825)	Homo sapiens <i>FGF9</i> (NM_002010)	Mus musculus <i>Fgf9</i> (NM_013518)	Rattus norvegicus <i>Fgf9</i> (NM_012952)
Sus scrofa <i>FGF9</i> (AY033825)	100%			
Homo sapiens <i>FGF9</i> (NM_002010)	93.7%	100%		
Mus musculus <i>Fgf9</i> (NM_013518)	90.4%	92.2%	100%	
Rattus Norvegicus <i>Fgf9</i> (NM_012952)	91.5%	93.8%	97.4%	100%

avec les séquences porcine et murine, la séquence porcine est un peu plus similaire à la séquence humaine (93,7%) que la séquence murine (92,2%).

3.3.4 Comparaison entre les séquences en acides aminés du gène *FGF9* chez le porc, l'humain, la souris et le rat

Les séquences en acides aminés de la protéine FGF9 sont comparées entre les espèces à la table X. Les séquences en acides aminées sont déduites des séquences codantes disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Tout comme les séquences codantes, les séquences en acides aminés sont très bien conservées entre les espèces. La séquence porcine a 99% de similarité avec la séquence humaine, 98,1% avec la séquence murine et 98,6% avec la séquence du rat. Par rapport à la séquence humaine, les séquences porcine et murine sont à égalité avec 99% de similarité. C'est la séquence de la protéine FGF9 du rat qui se rapproche le plus de la séquence humaine avec 99,5% de similarité.

Table X. Pourcentage de similarité existant entre les séquences en acides aminés de la protéine FGF9 qui découlent de la séquence codante du gène *FGF9* chez différentes espèces de mammifères.

ESPÈCES (Numéro d'accès dans GenBank)	Sus scrofa FGF9 (AY033825)	Homo sapiens FGF9 (NM_002010)	Mus musculus Fgf9 (NM_013518)	Rattus norvegicus Fgf9 (NM_012952)
Sus scrofa FGF9 (AY033825)	100%			
Homo sapiens FGF9 (NM_002010)	99%	100%		
Mus musculus FGF9 (NM_013518)	98.1%	99%	100%	
Rattus Norvegicus FGF9 (NM_012952)	98.6%	99.5%	99.5%	100%

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4 DISCUSSION

Depuis quelques années, les chercheurs étudiant la détermination/différenciation du sexe chez les mammifères tentent de préciser et de perfectionner leur modèle. En plus de *SRY* et de *SOX9*, un survol des autres gènes clés impliqués lors de la détermination du sexe tels que *WNT4*, *DAX1*, *WT1*, *DMRT1*, *SF1* et *MIS* révèle que les régulateurs transcriptionnels sont hautement représentés dans ce modèle. Les gènes manquants de cette voie comme ceux qui codent pour les molécules liées à la membrane, les molécules de signalisation et leurs récepteurs, les protéines de transport, les régulateurs de l'import/export nucléaire, les facteurs de croissance, les enzymes et les protéines structurales restent à être identifiés. Il s'agit en fait des gènes qui ont un rôle à jouer lors de la différenciation des sexes immédiatement après l'événement de la détermination des sexes. De nombreux efforts ont été faits afin de découvrir de nouveaux gènes candidats. Dans cette optique, plusieurs groupes se sont lancés soit dans des études de criblage de bibliothèques d'expressions différentielles dans les gonades en développement (Nordqvist et Tökönen, 1997 ; Grimmond *et al.*, 2000 ; Bowles *et al.*, 2000), soit dans des études de souris transgéniques (Colvin *et al.*, 2001). Ces études ont permis entre autre d'identifier trois gènes candidats chez la souris qui agiraient en aval de *Sry*, il s'agit des gènes *Vnn1*, *Pn1* et *Fgf9*. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, je me suis intéressé à ces trois gènes et je les ai étudiés dans le contexte de la détermination/différenciation du sexe chez le porc. De plus, j'ai ajouté un volet comparatif à mon projet qui allait me permettre de comparer les gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* porcine entre eux, mais aussi entre les espèces de mammifères.

4.1 MISE EN PLACE DES OUTILS MOLÉCULAIRES

Avant de débiter toute analyse, il a fallu mettre en place les outils moléculaires, c'est-à-dire cloner la séquence codante et la séquence 5' flanquante porcine de chacun des gènes choisis. Les gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* étant clonés seulement chez l'humain et chez la souris, il fallait opter pour une stratégie me permettant de cloner rapidement et facilement les séquences porcines.

4.1.1 Clonage des séquences codantes porcines des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9*

La technique de clonage utilisée pour cloner l'ADNc des trois gènes à l'étude avait déjà été mise en place dans le laboratoire au moment de mon arrivée, et elle avait permis le clonage de plusieurs gènes porcins impliqués lors de la détermination/différenciation du sexe. Cette stratégie se base sur la conservation des séquences codantes entre les différentes espèces. Les séquences codantes humaines et murines étant maintenant facilement accessibles dans les banques de données grâce aux grands projets de séquençage, il s'agissait de comparer pour chaque gène la séquence codante humaine avec la séquence codante murine. Les régions de forte similarité qui existaient entre ces séquences ont été utilisées dans le but de générer des amorces dites hétérologues. Ces amorces ont permis de produire un premier fragment de la séquence codante porcine de chaque gène à l'étude. À partir de la séquence de ce premier fragment, il a été possible de synthétiser des amorces spécifiques dites homologues pour compléter les séquences codantes porcines en allant chercher les séquences des extrémités 3' et 5'. Dans le cas du gène *VNN1* porcine, cette stratégie a permis de cloner 1668pb de la séquence codante porcine. Cette séquence a été soumise dans la banque de données GenBank (# AF350911). Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 21 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 1562. Dans un deuxième temps, il a été possible de cloner 1955pb de la séquence codante porcine du gène *PN1*. La séquence a été soumise sous le numéro d'accès AY059415 dans la banque de données GenBank. Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 20 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 1213. Finalement, la même stratégie a été utilisée dans le but de cloner 843pb de la séquence codante porcine du gène *FGF9*. La séquence a été également soumise dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accès AY033825. Le codon du début de la transcription est situé à la position nucléotidique 149 et le codon de la fin de la transcription est situé à la position nucléotidique 775.

4.1.2 Stratégies de clonage des séquences 5'flanquantes des gènes *VNN1*, *PN1* et *FGF9* porcin

Dans un premier temps, une méthode de clonage basée sur la création d'une mini-génothèque de tailles sélectionnées suivie d'une amplification par PCR ancré et d'une seconde amplification par PCR intégré ont été utilisées pour obtenir les séquences 5'flanquantes des trois gènes porcins. Pour le gène *VNN1*, cette technique a permis le clonage d'un premier fragment génomique porcin 5' de 1,9kb qui a ensuite été séquencé. Afin d'obtenir un plus grand fragment génomique 5' porcin pour le gène *VNN1*, une deuxième ronde de PCR ancré et intégré a été tentée sur la mini-génothèque de tailles sélectionnées, mais cette fois avec des amorces antisens spécifiques au bout 5' du premier fragment génomique de 1,9kb. Cette tentative s'est avérée sans succès. Dans le cas des gènes *PN1* et *FGF9* porcins, cette stratégie s'est avérée aussi inutile. Face à cette impasse, il fallait trouver un autre moyen pour cloner un plus grand fragment génomique 5' pour le gène *VNN1* porcin et aussi pour identifier les séquences 5'flanquantes des deux autres gènes porcins : *PN1* et *FGF9*.

La deuxième technique de clonage qui a été utilisée pour contourner les difficultés techniques est la création de quatre mini-librairies d'ADN génomique porcin non-clonés. Chacune des quatre mini-librairies contient l'ensemble du génome porcin, contrairement à la mini-génothèque de tailles sélectionnées. De plus, les quatre mini-librairies ne sont pas clonées dans un vecteur, ce qui réduit considérablement le temps de création relativement à la mini-génothèque de tailles sélectionnées où il faut passer préalablement par les étapes d'un immunobuvardage de type Southern, d'une extraction d'ADN industrielle et d'une ligation. Le criblage par PCR de chacune des quatre mini-librairies d'ADN génomique porcine a permis d'amplifier un deuxième fragment de la taille de 3,3kb en amont du premier fragment génomique 5' de 1,9kb du gène *VNN-1* porcin. La somme des deux séquences des deux fragments génomiques clonés donnait une séquence totale de 5kb pour la région promotrice du gène *VNN1* porcin. Cette longueur de promoteur a été jugée suffisante pour mes différentes études. Pour ce qui est du gène *PN1* porcin, cette deuxième stratégie a permis d'obtenir un fragment génomique de 500pb dans un premier temps et un

autre fragment de 3kb dans un deuxième temps. Les deux fragments ont été séquencés et mis ensemble pour donner une séquence totale de 3,5kb pour la région promotrice du gène *PN1* porcin. Finalement, cette deuxième technique s'est avérée aussi négative que la première dans le cas du clonage des séquences 5'flanquantes du gène *FGF9* porcin. Nous avons donc décidé de continuer nos travaux uniquement sur les gènes *VNN1* et *PN1* porcins.

4.2 CARACTÉRISATION DES SÉQUENCES CODANTES ET DES SÉQUENCES EN ACIDES DES GÈNES *VNN1*, *PN1* et *FGF9*

Suite au séquençage complet des ADNc des trois gènes porcins (*VNN1*, *PN1* et *FGF9*), chaque séquence a été soumise à une comparaison avec l'ensemble des séquences disponibles dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les séquences des espèces de mammifères qui possédaient une forte homologie avec les séquences porcines ont été sélectionnées et leur séquence codantes ont été comparées avec les séquences codantes des gènes porcins en terme de pourcentage de similarité.

4.2.1 Comparaison de l'homologie des séquences du gène *VNN1* chez différentes espèces

Outre les séquences humaine et murine du gène *VNN1*, on retrouve les séquences humaine et canine du gène *TIFF66* dans la liste des gènes qui possèdent une bonne similarité avec la séquence porcine. La séquence porcine du gène *VNN1* possède 84% d'homologie avec la séquence humaine, 76,6% avec la séquence murine et 84,1% avec la séquence canine du gène *TIFF66*. *VNN1* est donc un gène bien conservé entre les espèces. Par contre, il semble que la séquence codante porcine est plus proche des séquences humaine et canine que de la séquence murine. De plus, par rapport à la séquence codante humaine du gène *VNN1*, la séquence porcine est plus similaire (84%) que la séquence murine (78,5%).

Pour ce qui est de la séquence en acides aminés, elle semble aussi bien conservée entre les espèces. La séquence porcine est semblable à la séquence humaine à 79,3% et à la séquence murine à 76,2%. La protéine VANIN-1 porcine possède 78,6% d'homologie avec la protéine TIFF66 chez le chien domestique. Par rapport à la séquence en acides aminés humaine, la séquence porcine est plus similaire (79,3%) que la séquence murine (77,3%) et un peu moins que la séquence canine de la protéine TIFF66 (79,7%). Ces résultats sont semblables à ce qui avait été observé pour les séquences nucléiques.

4.2.2 Comparaison de l'homologie des séquences du gène *PN1* chez différentes espèces

Parmi les gènes qui ont une forte similarité avec le gène *PN1* porcin, on retrouve le gène de l'inhibiteur de la protéase sérine (*SERPINE 2*) bovin et humain, le gène de la NEXIN (*GLIA DERIVED NEXIN*) humain et de rat et le gène de l'inhibiteur 1 du plasminogène activé (*Plasminogen-activated-inhibitor 1*) de souris, humain et bovin. Malgré leurs noms différents, tous ces gènes sont en fait des gènes orthologues. Une nouvelle nomenclature a regroupé toutes ces protéines dans une superfamille d'inhibiteur de protéase sérine (SERPIN), dans la sous-classe E2 (Silverman *et al.*, 2001). La séquence codante du gène *PN-1* porcin possède de très hauts pourcentages de similarité avec le gène *GLIA-DERIVED NEXIN* chez l'humain (88,9%) et chez le rat (83,1%), avec le gène *SERPINE 2* chez le bovin (90,7%) et avec le gène *Plasminogen-activated-inhibitor 1* chez la souris (83,4%). Par rapport au gène *GLIA-DERIVED NEXIN* chez l'humain, la séquence codante du gène *PN1* porcin (88,9%) est un peu plus similaire que la séquence codante du gène *Plasminogen-activated-inhibitor 1* de souris (84%).

La séquence en acides aminés de la protéine NEXIN-1 porcine démontre un fort pourcentage de similarité avec les protéines codées par les gènes *GLIA-DERIVED NEXIN* humain (92,9%) et de rat (86,2%), par le gène *SERPINE 2* bovin (94,7%) et par le gène *Plasminogen-activated-inhibitor 1* de souris (87,2%). Par rapport à la séquence en acides

aminés humaine, la séquence porcine est plus similaire (92,9%) que la séquence murine (85,1%).

4.2.3 Comparaison de l'homologie des séquences du gène *FGF9* chez différentes espèces

La séquence codante du gène *FGF9* porcine est similaire à la séquence humaine à 93,7%, à la séquence murine à 90,4% et à la séquence du rat à 91,5%. La séquence de *FGF9* en acides aminés est très bien conservée entre les espèces. La séquence porcine a 99% de similarité avec la séquence humaine, 98,1% avec la séquence murine et 98,6% avec la séquence du rat. Par rapport à la séquence humaine, les séquences porcine et murine sont à égalité avec 99% de similarité. C'est la séquence de la protéine Fgf9 du rat qui se rapproche le plus à la séquence humaine avec 99,5% de similarité.

De façon générale, les gènes *VNN1*, *PNI* et *FGF9* et les protéines encodées par ces gènes démontrent une conservation variable entre les espèces. Le gène *VNN1* démontre une conservation moins forte. Il est possible de croire que ce gène ait connu des changements évolutifs rapides similaire à ceux observés pour le gène *SRY* (Whitfield *et al.*, 1993) et pour le gène *DAX1* (Swain *et al.*, 1996). Pour ce qui du gène *PNI*, il est plus conservé entre les espèces que le gène *VNN1*, mais moins que le gène *FGF9*. Le gène *FGF9* semble être le plus conservé des trois gènes. Il a probablement été très peu muté au cours de l'évolution des espèces. Cette molécule fait partie de la grande famille des FGFs qui régulent plusieurs processus développementaux (Ornitz et Itoh, 2001). Les homologues FGF ont été décrits chez la plupart des vertébrés, *D.melanogaster* et *C.elegans* (Szebenyi et Fallon, 1999). Par rapport aux autres gènes impliqués lors de la détermination du sexe chez les mammifères, les résultats de la comparaison des séquences du gène *FGF9* ressemblent à ceux des gènes *SOX9* (Wright *et al.*, 1995), *MIS* (Carré Eusèbe *et al.*, 1996) et *SF-1* (Pilon *et al.*, 2003).

Lors de ces mêmes études comparatives avec les gènes *VNN1*, *PNI* et *FGF9*, il a été trouvé que les séquences codantes porcines, ainsi que les séquences protéiques porcines

étaient plus similaires aux séquences humaines que les séquences de souris. C'est également ce qui se passe avec plusieurs autres gènes de la détermination du sexe. Entre les espèces de mammifère, le porc est un voisin génétiquement proche de l'humain et ces deux espèces sont éloignées de la souris dans les phylons génétiques. De plus, le génome de souris est soumis à un taux de mutation deux fois plus élevé que celui du génome humain. À cause de son cycle de vie relativement rapide, la souris a produit plus de générations que le porc et l'humain (Hugo, 2001).

Une analyse approfondie des homologies entre les séquences nucléique et protéique des trois gènes (*VNNI*, *PNI* et *FGF9*) montre des différences en taux de mutation. Dans le cas du gène *VNNI*, les pourcentages d'homologie sont plus élevés pour les acides nucléiques que pour les acides aminés. C'est exactement ce qui se passe dans le cas du gène *SRY* pour le même type de comparaison. Pour ce qui est du gène *PNI*, les pourcentages sont aussi élevés pour les acides nucléiques que les acides aminés. Le gène *PNI* serait donc un gène plus stable au niveau de ses séquences. Finalement, pour le gène *FGF9*, on observe un plus faible pourcentage d'homologie entre les séquences en acides nucléiques qu'entre les séquences en acides aminés. Ce qui suggère que les mutations qui sont survenues lors de l'évolution n'ont pas affecté la séquence protéique en tant que telle. Ainsi, il semble y avoir des pressions de mutations différentes pour les trois gènes en questions qui les ont amenés à évoluer différemment au cours du temps.

4.3 COMPARAISON DES SÉQUENCES 5'FLANQUANTES DES GÈNES *VNNI* et *PNI* ENTRE LES ESPÈCES.

Deux types d'analyses comparatives ont été faites sur les séquences 5'flanquantes des gènes *VNNI* et *PNI* chez le porc, l'humain et la souris. La première consistait à définir des gros blocs de séquences homologues qui pouvaient exister entre les séquences promotrices porcine, humaine et murine. Pour définir un gros bloc d'homologie, nous avons choisi des séquences de plus de 50 nucléotides qui possède plus de 60% d'homologie. Pour un fragment de promoteur de 5kb en amont du codon du début de la transcription, le gène *VNNI* porcin possède six gros blocs d'homologie d'au moins 60% de

similarité avec la séquence promotrice du gène *VNN1* humain, alors que la séquence promotrice murine ne contient que deux petits blocs d'homologie d'au moins 60% avec la séquence humaine. Les positions de ces blocs ne sont pas identiques, mais leur ordre est conservé. C'est un patron qui a déjà été observé pour d'autres promoteurs impliqués lors de la détermination et la différenciation du sexe (Boyer *et al.*, 2002; Pilon *et al.*, 2003). Ainsi, la forte similarité qui a été démontré antérieurement entre la séquence codante porcine et humaine du gène *VNN1* se reflète aussi au niveau des séquences génomiques. Ces observations suggèrent que pour une taille de 5kb, les promoteurs humain et porcin sont relativement bien conservés, alors que la séquence murine est moins bien conservée.

En ce qui concerne le gène *PNI*, à l'intérieur d'un fragment de 3,4kb de séquence génomique, 5 blocs d'homologie d'au moins 60% ont été retrouvés entre la séquence porcine et la séquence humaine, alors que 7 blocs d'homologie d'au moins 60% ont été retrouvés entre la séquence murine et la séquence humaine. La position des blocs est différente, mais encore une fois leur ordre relatif est conservé. De façon générale, les séquences génomiques des trois espèces semblent être plus similaires entre elles que les séquences génomiques du gène *VNN1*. En effet, il y a quatre régions qui sont conservées entre les trois espèces dans le cas du gène *PNI*, alors qu'il n'y en a aucune dans le cas du gène *VNN1*. Il en est de même pour les séquences codantes du gène *PNI*, où l'écart de pourcentage d'homologie entre la séquence murine et la séquence humaine est moins grand que l'écart qui existe entre la séquence murine et humaine pour le gène *VNN1*. Il est donc possible d'avancer l'hypothèse que le gène *PNI* puisse être contrôlé de façon semblable chez les trois espèces.

Cette même étude comparative a été effectuée antérieurement avec les séquences 5'flanquantes du gène *SRY* et du gène *DMRT1* chez différentes espèces (Pilon *et al.*, 2003; Boyer *et al.*, 2002). Les résultats obtenus corrélaient avec le fait que le porc était plus relié à l'humain que l'était la souris. Par contre, l'expression d'un gène marqueur GFP contrôlé par des séquences 5'flanquantes de 4,5kb du gène *SRY* porcin dans les crêtes génitales de souris transgéniques ont démontré que des éléments importants pour l'expression temporelle et l'expression tissu spécifique de *SRY* étaient conservés entre les espèces de mammifères (Daneau *et al.*, 2002). De plus, chez ces même souris, l'expression du transgène est semblable, mais pas identique au promoteur *Sry* murin (Daneau *et al.*, 2002).

Une autre expérience de souris transgénique où le gène marqueur GFP est contrôlé par des séquences 5'flanquantes du gène *DMRT1* porcin a démontré une expression identique à celle observée avec le promoteur *Dmrt1* murin (Boyer et al., 2002). Ainsi, ces études de comparaisons de promoteur ne sont là qu'à titre indicatif et elles ne sont pas suffisantes. Pour tirer des conclusions définitives, il est nécessaire d'aller vérifier *in vitro* et *in vivo* ces hypothèses pour pouvoir les confirmer.

Une fois la recherche des gros blocs d'homologie effectuée, une deuxième analyse comparative a été faite sur les séquences 5'flanquantes des gènes *VNNI* et *PN1*, mais cette fois de façon plus ponctuelle. Encore cette fois, cette étude allait seulement nous permettre de poser des hypothèses. Elle consistait en un premier temps à dénombrer et répertorier tous les sites potentiels de liaisons de facteurs de transcriptions impliqués lors de la détermination du sexe sur les séquences 5'flanquantes des gènes *VNNI* et *PN1* porcin, humain et murin. À première vue, des sites pour tous les facteurs de transcriptions analysés (SRY, SOX9, WT1, SF1, GATA, LHX9) ont été retrouvés sur la séquence 5'flanquante porcine du gène *VNNI* porcin. Dans le cas de la séquence 5'flanquante du gène *PN1* porcin, seul le site de liaison consensus de LHX9 n'a pas été retrouvé. On peut proposer trois hypothèses, soit que le facteur LHX9 n'a aucun effet sur l'expression du gène porcin à l'intérieur du 3,4kb analysé, soit qu'il a un effet, mais son site de liaison est encore inconnu ou tout simplement qu'il y a un effet indirect sans se lier à l'ADN (via des interactions protéine-protéine avec d'autres régulateurs transcriptionnels). Contrairement à l'étude de la conservation des blocs d'homologie, les sites de liaisons ne semblent pas garder une position ou un ordre conservé entre les espèces. Ce patron de manque de conservation a déjà été noté antérieurement (Brunelli *et al.*, 2003)

De façon générale, pour chaque facteur de transcription à l'étude, il y a moins de sites de liaisons potentiels retrouvés sur la séquence 5' flaquante du gène *VNNI* murin que sur les séquences porcine et murine. Alors que dans le cas du gène *PN1*, il semble y avoir autant de possibilités chez la souris que chez le porc ou l'humain. Ces constatations viendraient rejoindre ce qui a été précédemment observé dans l'étude de conservation de gros blocs d'homologie entre les espèces.

Cinq sites de liaisons potentiels ont été retrouvés à l'intérieur des six régions conservées entre les séquences humaine et porcine du gène *VNNI*. Parmi eux, on en retrouve un pour le facteur SOX9, un pour le facteur SRY et trois pour le facteur SF1. À l'intérieur des deux régions conservées entre la souris et l'humain, aucun site potentiel conservé n'a été déterminé. À cette étape, il était donc possible de croire qu'au moins un des trois facteurs (SOX9, SRY ou SF1) puisse agir directement sur la transcription du gène *VNNI* porcin et humain. Par contre, il était possible aussi que d'autres facteurs de transcription puissent quand même avoir un effet sur la régulation. En effet, il se peut que les sites de liaisons ne se situent pas nécessairement à l'intérieur des grandes régions conservées et il se peut que d'autres sites de reconnaissance encore inconnus puissent permettre la liaison d'un de ces facteurs. Aussi, il est connu qu'un facteur de transcription peut fonctionner autrement que par un site de reconnaissance à l'ADN. En effet, il peut faire une liaison avec un autre facteur de transcription qui lie l'ADN. C'est seulement par des études *in vitro* qu'il nous sera possible de déterminer quels facteurs ont un effet direct sur la régulation du gène *VNNI* porcin, humain et murin.

Pour ce qui est du gène *PNI*, il y a cinq sites de liaisons qui ont été retrouvées à l'intérieur des quatre régions conservées entre les trois espèces. Il y a deux sites potentiels pour le facteur WT1, deux sites pour le facteur SF1 et un site pour les facteurs GATA. Il était donc intéressant d'observer si au moins un de ces trois facteurs peut avoir un effet direct sur la régulation du gène *PNI* porcin.

4.4 ÉTUDE DE RÉGULATION DES GÈNES *VNNI* ET *PNI* PORCINS DANS LES CELLULES CV-1

L'analyse des sites potentiels de liaison sur le promoteur des gènes *VNNI* et *PNI* porcins a permis de poser des hypothèses sur les facteurs qui pourraient avoir un effet direct sur leurs expressions. Par contre, c'est à l'aide d'études *in vitro* qu'il est possible de déterminer quels facteurs peuvent réellement avoir un effet. Des séquences 5'flanquantes du gène *VNNI* (5kb) et du gène *PNI* (3,4kb) ont été insérées respectivement dans un vecteur rapporteur en amont du gène de la GFP. Chacune des constructions a été co-

transfectée dans des cellules CV-1 (modèle hétérologue) avec des quantités croissantes d'ADNc de différents facteurs de transcription impliqués lors de la détermination du sexe (SRY, SOX9, WT1, SF1, GATA, LHX9). Les cellules CV-1 sont des fibroblastes de rein de singe vert qui n'expriment pas les gènes normalement impliqués dans les crêtes génitales.

4.4.1 Effet contradictoire de Gata4 murin sur la régulation des gènes

***VNN1* et *PN1* porcin**

Dans le cas du gène *VNN1* porcin, le facteur Gata4 murin inhibe l'expression de la GFP. À une concentration de 100ng/puits de facteur Gata4, l'expression du promoteur est réduite d'environ 2 fois par rapport au contrôle sans Gata4 murin. Pour ce qui est du gène *PN1* porcin, c'est le contraire. Gata4 murin (100ng/puits) active d'au moins 2 fois l'expression du promoteur *PN1* porcin. Ainsi, un même facteur peut avoir deux effets différents sur des promoteurs différents. Des analyses de transfections qui utilisent les mêmes cellules CV-1 ont montré que GATA4 pouvait réguler l'expression du gène MIS et de plusieurs autres enzymes impliquées lors de la stéroïdogénèse (Tremblay *et al.*, 1999). Cette activation implique une interaction protéine-protéine avec le facteur SF1 permettant une activation synergétique des gènes ciblés (Tremblay *et al.*, 2001). Sur le promoteur du gène *PN1* porcin (Fig. 21), il existe un site de liaison potentiel intéressant (-1151) pour les facteurs GATA qui est probablement conservée chez l'humain (-1507) et la souris (-1508). Dans le cas du promoteur de *VNN1* porcin, nous n'avons pas prévu de séquences consensus potentiellement conservées entre les trois espèces. Par contre, il existe des sites en dehors des régions conservées chez le porc qui pourraient être potentiellement reconnus.

4.4.2 Effet de SOX9 sur la régulation des gènes *VNN1* et *PN1* porcin

Nous avons observé que le facteur de transcription SOX9 porcin pouvait transactiver le promoteur *VNN1* porcin d'environ 2 fois par rapport au contrôle sans SOX9 porcin. Dans la littérature, il a été démontré que SOX9 était un régulateur essentiel du

promoteur du gène *MIS* (de Santa Barbara *et al.*, 1998). SOX9 possède un élément de liaison conservé sur le promoteur de *MIS* qui est requis pour la transactivation de *MIS*. De plus, SOX9 agit en synergie avec le facteur SF1 pour maintenir de hauts niveaux d'expression de *MIS*. Chez la souris, une mutation dirigée au niveau du site de liaison du facteur SOX9 sur le promoteur *MIS* abolit l'expression de *MIS* (Arango *et al.*, 1999). Sur le promoteur du gène *VNN1* porcin (Figure 10), nous avons dénombré au moins trois sites de reconnaissance pour le facteur SOX9. Par contre, aucun de ces trois sites n'est conservés entre les trois espèces. SOX9 semble avoir plusieurs cibles dans les testicules en développement ; en plus de *MIS*, il a été démontré que SOX9 pouvait transactiver le promoteur porcin du gène *SRY* (Pilon *et al.*, 2003) et le promoteur de *SF1* (Shen *et al.*, 2002). Récemment, il a été démontré qu'un nouveau gène humain, *KIAA0800*, préférentiellement exprimé dans les testicules en développement pouvait être transactivé par SOX9 (Zhao *et al.*, 2002). Pendant la chondrogénèse, SOX9 est connu pour contrôler de multiples gènes (Bell *et al.*, 1997 ; Lefebvre *et al.*, 1997 ; Sekiya *et al.*, 1997 ; Xie *et al.*, 1999). Lorsqu'on substituait le facteur SOX9 porcin par le facteur Sox9 murin, nous observions le même type d'activation. Sox9 murin semble reconnaître le promoteur du gène *VNN1* porcin tout comme le facteur SOX9 porcin. Ceci n'est pas surprenant étant donné que le gène *SOX9* est fortement conservé entre les espèces contrairement au facteur *SRY*. Pour ce qui est du promoteur *PN1* porcin, SOX9 porcin et murin n'ont démontré aucun effet sur l'expression du marqueur GFP. Ces résultats semblent logiques par rapport aux observations faites lors de notre analyse de sites potentiels où nous n'avons pas trouvé de séquences consensus conservées entre les trois espèces pour le facteur SOX9.

4.4.3 Le facteur SOX9 porcin inhibe la transactivation du gène *PN1* porcin produit par le facteur GATA4

De nos jours, un concept émerge concernant la régulation des gènes requis pour la différenciation sexuelle. Ce concept propose que ces gènes soit contrôlés par des interactions coopératives entre les différents facteurs de transcriptions, facteurs clés de la détermination du sexe. Ce concept se base surtout sur les observations faites avec le gène de différenciation sexuelle le plus étudié : le gène *MIS*. Dans le cas de la régulation du gène *MIS*, SOX9 interagit physiquement avec SF1 tout comme WT1 et GATA4 et ces

interactions induisent une activation synergique du gène *MIS*. (Tremblay et Viger, 1999 ; Arango *et al.*, 1999). De plus, l'effet de ces interactions peut être antagonisé par DAX1 via une interaction avec SF1 (Swain *et al.*, 1998). Comme il a été mentionné plus haut, nous avons observé que le promoteur *PN1* porcin pouvait être transactivé seulement par le facteur Gata4 murin. Suite à ce résultat, notre premier réflexe a été de vérifier si l'effet de GATA4 pouvait être optimisé par quelconques partenaires. C'est le contraire que nous avons observé. En fait, le facteur SOX9 semble inhiber l'effet de transactivation du promoteur par GATA4. Lorsqu'il est seul, le facteur SOX9 porcin ne semble pas capable d'affecter directement l'expression du marqueur GFP sous le promoteur *PN1* porcin. C'est lorsqu'il est co-transfecté en même temps que le facteur Gata4 murin qu'il se produit une diminution de l'activation normale de Gata4. L'expression de la GFP revient au même niveau que le contrôle sans Gata4 murin. À ce jour, dans la littérature, on dénombre certains cas de facteurs qui inhibent l'expression de gènes dans le cadre du développement des testicules. Il y a des études de culture de cellules et une étude de souris transgénique (Swain *et al.*, 1998) qui suggère que DAX1 peut inhiber l'expression d'un certain nombre de gènes qui contrôlent le développement sexuel mâle, probablement en inhibant leur activation causée par SF1. De plus, tout récemment, des études de transfections ont démontré que le TNF α supprimait le promoteur *MIS* qui était activé par le facteur SF1 (Hong *et al.*, 2003). Finalement, il a été montré qu'un cofacteur utilisé par la famille GATA appelé Friends of GATA2 ou FOG2 et lorsque co-exprimé avec le facteur GATA4 lors du développement des gonades pouvait inhiber l'activation transcriptionnelle de GATA4 (Roberts *et al.*, 2002).

4.4.4 Comparaison de l'effet du facteur SOX9 sur les promoteurs *VNN1* porcin, humain et murin

Suite à l'observation de l'effet d'activation du facteur SOX9 sur le promoteur *VNN1* porcin dans les cellules CV-1, nous avons vérifié les effets de ce même facteur, mais sur les promoteurs humain et murin de ce même gène. Il s'est avéré que les facteurs SOX9 porcin et murin n'avaient aucun effet sur les promoteurs humain et murin, contrairement au promoteur porcin. Si on retourne à la comparaison des sites potentiels de reconnaissance

pour le facteur SOX9 sur les promoteurs des trois espèces (Figure 10), on observe un seul site potentiel connu de SOX9 sur la séquence murine et il n'est pas conservé entre les espèces. Le résultat *in vitro* n'est donc pas surprenant. Pour ce qui est de la séquence humaine, il y a trois sites potentiels, mais seulement un qui est potentiellement conservé entre l'humain et le porc (-119). Il est possible que ce site ne soit véritablement pas reconnu par le facteur SOX9. Ainsi, à première vue, il est possible de croire que l'effet du facteur SOX9 est spécifique à l'espèce et que d'autres facteurs agiraient directement sur les promoteurs humain et murin. Il suffirait de tester l'effet des autres facteurs tels que SRY, WT1, SF1, LHX9 et GATA4 sur ces deux promoteurs.

L'activation du promoteur *VNN1* porcin par SOX9 est par contre assez faible (2X). Néanmoins, il ne faut pas écarter le fait qu'il pourrait exister des séquences sur le promoteur capable d'inhiber l'effet de SOX9. Une longueur de 5kb de promoteur du gène *VNN-1* porcin donne un assez grand fragment et il y a plus de chances d'englober des séquences qui feraient interférer les effets des facteurs de transcription entre eux. Il faudrait alors vérifier *in vitro* l'effet du facteur SOX9 sur un plus petit fragment de promoteur porcin.

À ce jour, peu de choses sont connues sur la régulation transcriptionnelle des gènes *VNN1*, *PNI* et *FGF9*. Pour ce qui est du gène *VNN1*, son expression est augmentée dans le foie de souris suite à un traitement avec le di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Wong et Gill, 2002) et suite à un traitement avec deux agonistes différents du « peroxisome proliferator-activated receptor alpha » (PPAR alpha) : Wy-14,643 et fenofibrate (Yamazaki *et al.*, 2002). Aucune étude de régulation directe ne semble avoir été effectuée. Dans le cas du gène *PNI*, il semble que le promoteur humain serait régulé par Sp1 via des liaisons avec des éléments riches en GC dans la région 5' proximale (Guttridge *et al.*, 1996). Des mutations ponctuelles dans le site de liaison « E-box » qui abolissent la liaison d'un facteur « upstream stimulatory factor » (USF) augmente l'activité transcriptionnelle du promoteur *PNI* (Erno *et al.*, 1996). De plus, les facteurs de transcription Krox semblent pouvoir contrôler l'expression de *PnI* de rat (Erno *et al.*, 1996). Finalement, pour le gène *FGF9*, il a

été identifié comme étant une cible transcriptionnelle de la « beta-catenin/T-cell factor » dans les adenocarcinomes endométrioides ovariens (Shwartz et al., 2003).

Finalement, il semble que le marqueur GFP n'est pas idéal pour des études *in vitro*. En effet, nous avons observé que le bruit de fond de la fluorescence est assez élevé. Il serait alors possible d'utiliser le marqueur de la luciférase qui semble plus sensible que la GFP comme marqueur. La luciférase est couramment utilisée lors d'études de transfection. Il est possible d'obtenir un bon ratio entre le signal spécifique et le bruit de fond. Les avantages d'un marquage à la GFP : il n'implique pas une réaction enzymatique, il n'a pas besoins de substrats et la lecture de la fluorescence se fait relativement facilement. Par contre, le désavantage, c'est l'autofluorescence des cellules qui augmentent le bruit de fond. Les avantages d'un marquage à la luciférase : il y a un bruit de fond minimal qui augmente la chance de détecter un signal spécifique.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

5 CONCLUSION

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai tenté de caractériser trois nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués lors de la détermination du sexe : *VNNI*, *PNI* et *FGF9*. Dans un premier temps, j'ai cloné l'ADNc porcin de ces trois gènes. Les séquences en acides nucléiques et les séquences en acides aminés des gènes porcins *VNNI*, *PNI* et *FGF9* ont différents niveaux de conservation entre les espèces. Le gène *FGF9* étant le plus conservé et le gène *VNNI* étant le moins conservé.

Dans un deuxième temps, j'ai développé une double stratégie de clonage qui m'a permis d'obtenir 5kb de région promotrice pour le gène *VNNI* porcin et 3,4kb de région promotrice pour le gène *PNI* porcin. Les séquences ont été comparées avec les séquences humaine et murine disponibles dans les banques de données et j'ai observé des similarités et des différences entre les espèces.

Dans un troisième temps, les séquences promotrices ont été insérées dans un vecteur rapporteur, en amont du gène marqueur GFP. Ces constructions m'ont permis de faire des études de transfections transitoires dans les cellules CV-1. Ces études m'ont permis de déterminer si au moins un des facteurs de transcription clés de la détermination du sexe, soit SRY, SOX9, LHX9, WT1, SF1 ou GATA4 pouvait avoir un effet direct sur l'expression des gènes *VNNI* porcin et *PNI* porcin. Il s'est avéré que les facteurs SOX9 porcin et Sox9 murin pouvaient transactiver le promoteur du gène *VNNI* porcin. Par contre, ils ne pouvaient pas transactiver les promoteurs humain et murin du gène *VNNI*. De plus, j'ai observé que le facteur Gata4 murin pouvait inhiber l'activité basale du promoteur *VNNI* porcin. Tous les autres facteurs testés (SRY, LHX9, WT1 et SF1) n'ont démontré aucun effet direct dans notre système. Par contre, d'autres modèles de cellules hétérologues en plus des CV-1 auraient pu être utilisés.

Dans le cas du gène *PNI* porcin, seul le facteur Gata4 murin avait un effet direct sur l'expression du marqueur GFP. Contrairement au gène *VNNI*, le facteur GATA4 avait un effet activateur. SOX9 porcin n'avait aucun effet direct lorsqu'il était co-transfecté seul. Néanmoins, j'ai observé que le facteur SOX9 porcin pouvait annuler l'effet de

transactivation du promoteur *PN1* porcin par le facteur Gata4 murin. Les interactions de ces deux facteurs sur le promoteur *PN1* porcin restent à préciser.

Ainsi, à mes yeux, les résultats obtenus ainsi que le travail effectué constituent une importante contribution à nos connaissances sur la détermination du sexe chez les mammifères. Ces études sont seulement les prémisses à d'autres études qui augmenteront la valeur de mes trouvailles.

CHAPITRE 6

PERSPECTIVES

6 PERSPECTIVES

Ainsi, nos études ont permis une meilleure compréhension de la régulation des gènes *VNN1* et *PNI* lors de la détermination et de la différenciation du sexe chez différentes espèces de mammifères. Par contre, nos études ne sont que les prémises d'une longue liste d'expériences à suivre... Dans un premier temps, il serait intéressant de faire des études de délétion sur les promoteurs *VNN1* et *PNI* porcins afin de déterminer les vrais sites de reconnaissance des facteurs SOX9 et GATA4 sur le promoteur *VNN1* porcine et du facteur GATA4 sur le promoteur *PNI* porcine. Étant donné que les facteurs de transcription fonctionnent sous forme de complexe pour activer ou inhiber un gène, il serait bien de faire des études de co-transfection en faisant différentes combinaisons de facteurs (SOX9, SRY, SF1, WT1, GATA4, DAX1 et LHX9). Ces études permettraient d'identifier des partenaires de SOX9 lors de la transactivation du promoteur *VNN1* porcine, des partenaires de GATA4 lors de l'inhibition du promoteur *VNN1* porcine et lors de la transactivation du promoteur *PNI* porcine. Dans le but de compléter notre analyse comparative *in vitro* de la régulation du gène *VNN1* entre les espèces, nous pourrions tester l'effet des autres facteurs de transcription (SRY, WT1, SF1, LHX9, DAX1 et GATA4) sur les promoteurs humains et murin. Finalement, il serait possible d'observer si les gènes *VNN1* et *PNI* porcine sont directement reconnus dans un contexte de crêtes génitales porcine. Les cellules CV-1 qui ont été utilisées dans les études que nous avons présentées n'expriment pas les gènes normalement exprimés dans des crêtes génitales mâles en développement. Le laboratoire possède néanmoins une lignée de cellule de crêtes génitales porcines appelé les PGR9E11 qui expriment les facteurs de transcriptions impliqués lors de la détermination du sexe (Pilon *et al.*, 2003).

CHAPITRE 7

RÉFÉRENCES

7 RÉFÉRENCES

- Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL.** (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat. Genet.* 22: 125-126.
- Albrecht KH, Eicher EM.** (2001) Evidence that SRY is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and Granulosa cells have a common precursor. *Dev. Bio.* 240: 92-107.
- Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR.** (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter : in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99(4): 409-419.
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans DA, Harley VR.** (2003) A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear importin campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J. Biol. Chem.* 278(36): 33839-33847.
- Aurrand-Lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P.** (1996) Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity* 5(5): 391-405.
- Baker BS, Ridge KA.** (1980) Sex and the single cell.I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 94: 383-423.
- Baird PN, Groves N, Haber DA, Housman DE, Cowell JK.** (1992) Identification of mutations in the *WT1* gene in tumors from patients with the WAGR syndrome. *Oncogene* 7(11): 2141-2149.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley K, et al.** (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* 7: 497-501.

Barnes JD, Crosby JL, Jones CM, Wright CV, Hogan BL. (1994) Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of *Xenopus* Xlim-1, suggest a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev. Biol.* 161(1): 168-178.

Bedell MA, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ. (1995) DNA rearrangements located over 100kb 5' of the *Steel* (*SI*)-coding region in *Steel-panda* and *Steel-contrasted* mice deregulate *SI* expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev.* 9: 455-470.

Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC. (1993) Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome. *Genomics* 17(3): 736-739.

Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. (1994) Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79: 415-425.

Behringer RR. (1995) The Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 350: 285-289.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16(2): 174-178.

Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins JR, Grant D. (1993) Deletion 9p and sex reversal. *J. Med. Genet.* 30: 518-520.

Bergstrom DE, Young M, Albrecht KH, Eicher EM. (2000) Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* 28(3-4): 111-24.

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor BL, Griffiths BN. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348: 448-450.

Bertuzzi S, Porter FD, Pitts A, Kumar M, Agulnick A, Wassif C, Westphal H. (1999) Characterization of Lhx9, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex. *Mech. Dev.* 81(1-2): 193-198.

Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H. (2000) The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403(6772): 909-913.

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, AgoulNIK AI, AgoulNIK IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. (2000a) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* 26(4): 490-4.

Bishop CE, Withworth DJ, AgoulNIK AI, AgoulNIK IU, Qin Y, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. (2000b) Male sexual development in the absence of Sry. *Nat. Genet.* 26(4): 490-494.

Bowles J, Bullejos M, Koopman P. (2000) A subtractive gene expression screen suggests a role for vanin-1 in testis development in mice. *Genesis*. Jul;27(3):124-35.

Boyer A, Dornan S, Daneau I, Lussier J, Silversides DW. (2002) Conservation of the function of DMRT1 regulatory sequences in mammalian sex differentiation. *Genesis* 34(4): 236-43.

Brennan J, Karl J, Capel B. (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of SRY establish the arterial system in the XY gonad. *Dev. Biology* 244: 418-429.

Brunelli S, Silva Casey E, Bell D, Harland R, Lovell-Badge. (2003) Expression of SOX3 throughout the developing central nervous system is dependent on the combined action of discrete evolutionary conserved regulatory elements. *Genesis* 36: 12-24.

Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE. (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 11(3): 1707-1712.

Buehr M, Gu S, McLaren A. (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273-281.

Bull JJ. (1983). *Evolution of Sex determination mechanisms*. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 316pp.

Bullejos M, Bowles J, Koopman P. (2001a) Searching for missing pieces of the sex-determination puzzle. *J. Exp. Zool.* 290(5): 517-22.

Bullejos M, Koopman P. (2001b) Spatially dynamic expression of SRY in mouse urogenital ridges. *Dev. Dynam.* 221: 201-205.

Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P, Rossant J, McLaren A. (1988) Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX—XY chimaeric mouse testes. *Development* 102(2): 443-450.

Burris TP, Guo W, Le T, McCabe ERB. (1995) Identification of a putative SF-1 responsive element on the DAX-1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 576-581.

Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms'tumor locus. *Cell* 60(3): 509-20.

Cantor AB, Orkin SH. (2001) Hematopoietic development : a balancing act. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(5): 513-519.

Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1993) Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 73(5): 1019-1030.

Capel B, Albreicht KH, Washburn LL, Eicher EM. (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on SRY. *Mech. Dev.* 84: 127-131.

Carré Eusèbe D, di Clemente N, Rey R, Pieau C, Vigier B, Josso N, Picard J-Y. (1996) Cloning and expression of the chick anti müllerian hormone gene. *J. Biol. Chem.* 271: 4798-4804.

Carter DA, et al. (1997) Modulation of cellular AP-1 DNA binding activity by heat shock proteins. *FEBS Lett.* 416: 81-85.

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, et al. (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45: 685-698.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) A single-step method for RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 153-169.

Clarkson MJ, Harley VR. (2002) Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends Endocrinol. Metab.* 13(3): 106-11.

Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS. (1994) Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134(3): 1499-1508.

Clépet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovelle-Badge R, Goodfellow PN. (1993) The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2007-2012.

Cline TW et Meyer BJ. (1996) Vive la difference : males vs females in flies vs worms. *Annu. Rev. Genet.* 30: 637-702.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1996) A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122(2): 509-520.

Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, Goldfarb M, Ornitz DM. (1999). Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev. Dyn.* 216: 72-88.

Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. (2001) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104(6): 875-89.

Crocker M, Coghill SB, Cortinho R. (1998) An unbalanced autosomal translocation (7; 9) associated with feminization. *Clin. Genet.* 34: 70-73.

Dale TC. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329: 209-223.

Daneau I, Houde A, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. (1995) Bovine SRY gene locus : cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* 52(3): 591-599.

Daneau I, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. (1996) Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol. Reprod.* 55(1): 47-53.

Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA, Viger R, Lussier J, Silversides DW. (2002) The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33: 170-180.

DeGrandi A, Calvari V, Bertini V, Bulfone A, Peverali G, Camerino G, Borsani G, Guioli S. (2000) The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech. Dev.* 90: 323-326.

Denny P, Swift S, Connor F, Ashworth A. (1992) An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *EMBO J.* 11(10): 3705-3712.

De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Descloseaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and

steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-mullerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6653-6665.

De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. (2000) Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dyn.* 217(3): 293-298.

De Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, MacIès M-H, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (2001) Steroidogenic factor 1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol. Reprod.* 64: 775-783.

Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (1998) Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1397(3): 247-252.

Dolci S, Grimaldi P, Geremia R, Pesce M, Rossi P. (1997) Identification of a promoter region generating Sry circular transcripts both in germ cells from male adult mice and in male mouse embryonal gonads. *Biol. Reprod.* 57(5): 1128-1135.

Du X, Hublitz P, Gunther T, Wilhelm D, Englert C, Schule R. (2002) The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1577(1): 93-101.

Dubin R, Ostrer H.(1994) Sry is a transcriptional activator. *Mol. Endocrinol.* 8: 1182-1192.

Eicher EM, Shown EP, Washburn LL. (1995) Sex reversal in C57BL/6J-Ypos mice corrected by a Sry transgene. *Philos. Trans. R. Soc. Ser. B350:* 263-269.

Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell R et al. (1995) Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild type protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11960-11964.

Erdman SE, Burtis KC. (1993) The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J.* 12: 527-535.

Erno H, Kury P, Botteri FM, Monard D. (1996) A Krox binding site regulates protease nexin-1 promoter activity in embryonic heart, cartilage and parts of the nervous system. *Mech. Dev.* 60(2): 139-150.

Erno H, Kury P, Nitsch C, Jost JP, Monard D. (1996) Excitotoxic brain lesion modifies binding to a USF binding site acting as a negative regulatory element in the Protease nexin-1 promoter. *Mol. Cell. Neurosci.* 8(1): 28-37.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11(12): 4497-4506.

Flejter WL, Fergestad J, Gorski J, Varvill T, Chandrasekharappa S. (1998) A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 794-802.

Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1: 771-713.

Foster JW, Graves JA. (1994) An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome : implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(5): 1927-1931.

Foster JW, Dominguez-Stglic MA, Guioli S, Kowk, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506): 525-530.

Francis RC, Soma K, Fernald RD. (1993) Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7791-7798.

Galland F, Malergue F, Bazin H, Mattei MG, Aurrand-Lions M, Theillet C, Naquet P. (1998) Two human genes related to murine vanin-1 are located on the long arm of human chromosome 6. *Genomics* 53: 203-213.

Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B. (2002) A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99(17): 11199-204.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110(2): 521-528.

Giulli G, Shen W-H, Ingraham HA. (1997) The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian inhibiting substance, in vivo. *Development* 124: 1799-1807.

Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1993) SRY and sex determination in mammals. *Ann. Rev. Genet.* 27: 71-92.

Granjeaud S, Naquet P, Galland F. (1999) An ESTs description of the new gene family conserved from fly to human. *Immunogenetics* 49: 964-972.

Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, Soares MB, de Fatima Bonaldo M, Smith L, Tymowska-Lalanne Z, Wells C, Greenfield A. (2000) Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum. Mol. Genet.* 9(10): 1553-60.

Grosschedl R, Giese K, Pagel J. (1994) HMG domain proteins : architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10: 94-100.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of

the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346(6281): 245-250.

Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1992) Inverted repeat structure of the SRY locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(17): 7953-7957.

Guioli S, Schmitt K, Critcher R, Bouzyk M, Spurr NK, Ogata T, Hoo JJ, Pinsky L, Gimelli G, Pasztor L, Goodfellow PN. (1998) Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal : refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am. J. Genet.* 63: 905-908.

Guttridge DC, Cunningham DD. (1996) Characterization of the human protease nexin-1 promoter and its regulation by Sp1 through a G/C-rich activation domain. *J. Neurochem.* 67(2): 498-507.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995) Expression of SRY, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6): 1603-1614.

Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106: 319-329.

Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. (1999) Expression of steroidogenic factor 1 and Wilm's tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* 87 (1-2): 175-180.

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. (2000) SRY, SOX9, and Dax-1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 91(1-2): 403-407.

Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255(5043): 453-456.

Harley VR, Goodfellow PN. (1994) The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol. Reprod. Dev.* 39(2): 184-193.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acid Res.* 22(8): 1500-1501.

Harley VR. The molecular action of testis-determining factors SRY and SOX9. In the *Genetics and Biology of Sex Determination* (Short, J., ed) John Wiley and Sons (in press).

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, Hextall PJ. (1996) The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391: 24-28.

Haqq CM, Donahoe PK. (1998) Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol. Rev.* 78 (1): 1-33.

Ho IC, Glimcher LH. (2002) Transcription : tantalizing times for T cells. *Cell* 109: S109-S120.

Hobert O, Westphal H. (2000) Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16(2): 75-83.

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. (1994) *Manipulating the mouse embryo*, ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. (1993) Ad4BP regulating steroidogenic P450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 268: 7494-7502.

Hong CY, Park JH, Seo KH, Kim J-M, Im, SY, Lee JW, Choi H-S, Lee K. (2003) Expression of MIS in the testis is downregulated by tumor necrosis factor alpha through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-kB. *Mol. Cell. Biol.* 23(17): 6000-6012.

Hossain A, Saunders GF. (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J. Biol. Chem.* 276: 16817-16823.

Huang B Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley T. (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87: 349-353.

Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. (1993) The murine *steel panda* mutation affects *kit* ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev. Biol.* 157: 100-109.

HUGO (Human Genome Organization). (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Ikeda Y, Shen W-H, Ingraham H, Parker K. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8: 654-662.

Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9: 478-486.

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. (1996) Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages : potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol.* 10: 1261-1272.

Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 8: 2302-2312.

Ito M, Yu R, Jameson JL. (1997) DAX-1 inhibits SF-1 mediated transactivation via a carboxyl-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1476-1483.

Jacobs PA, Strong JA. (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302-303.

Jacobsen CM, Narita N, Bielinska M, Syder AJ, Gordon JI, Wilson DB. (2002) Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium. *Dev. Biol.* 241: 34-46.

Jager RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348: 452-454.

Jans DA, Xiao CY, Lam MH. (2000) Nuclear targeting signal recognition : a key control point in nuclear transport? *BioEssays* 22: 532-544.

Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344 (6269): 830-836.

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B. (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by Wnt-4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130(16): 3663-3670.

Jeffs B, Meeks JJ, Ito M, Martinson FA, Matzuk MM, Jameson JL, Russell LD. (2001) Blockage of the rete testis and efferent ductules by ectopic Sertoli and Leydig cells causes infertility in Dax1-deficient male mice. *Endocrinology* 142(10): 4486-95.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P et al. (2001) Up-regulation of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1102-1109.

- Jost A.** (1947) Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 36: 271-315.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Kandoh H.** (2000) Pairing of SOX off: partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16: 182-187.
- Karl J, Capel B.** (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203: 323-333.
- Kawabe K, Shikayama T, Tsuboi H, Oka S, Oba K, Yanase T, Nawata H, Morohashi K.** (1999) Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.* 13(8): 1267-1284.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P.** (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122(9): 2813-2822.
- Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J.** (1999) The Wilm's tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 2289-2299.
- Kim S, Kettlewell JR, Anderson RC, Bardwell VJ, Zarkower D.** (2003) Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Exp. Pat.* 3: 77-82.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovelle-Badge R.** (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351(6322): 117-121.
- Koopman P, Bullejos M, Bowles J.** (2001) Regulation of male sexual development by Sry and Sox9. *J. Exp. Zool.* 290(5): 463-74.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R.** (1993) WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74(4): 679-691.

Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Pharmacek MS, Soudais C, Leidan JM. (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11(8): 1048-1060.

Ladomery MR, Slight J, MC GS, Hastie ND. (1999) Presence of the WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear poly (A)(+) ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 274: 36520-36526.

Lala DS, Rice DA, Parker KL. (1992) Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol. Endocrinol.* 6: 1249-1258.

Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P. (1998) DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 139(10): 4237-4243.

Lalli E, Ohe K, Latorre E, Bianchi ME, Sassone-Corsi P. (2003) Sexy splicing : regulatory interplays governing sex determination from *Drosophila* to mammals. *J. Cell Sci.* 116(3): 441-445.

Langman J, Sadler TW. (1996) Embryologie médicale. 6^{ième} édition. Éditions Pradel. Paris.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, et al. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, De Crombrughe B. (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro-alpha-1 (II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2336-2346.

Li B, Zhang W, Chan G, Jancso-Radek A, Liu S, Weiss MA. (2001) Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. A clinical correlation. *J. Biol. Chem.* 276(49): 46480-46484.

Lovell-Badge R, Robertson E. (1990) XY female mice resulting from an heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development* 109 : 635-646.

Lu JR, McKinsey TA, Xu H, Wang DZ, Richardson JA, Olsen EN. (1999) FOG-2, a heart-and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4495-4502.

Luo X, Ikeda Y, Parker KL. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.

Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA. (1993) Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* 7(6): 776-786.

Madl JE et Herman RK. (1979) Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 93: 393-402.

Maheswaran S, Englert C, Zhang G et al. (1998) Inhibition of cellular proliferation by the Wilm's tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70. *Genes Dev.* 12: 1108-1120.

Malik S, Guermah M, Roeder RG. (1998) A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2192-2197.

Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. (1995) A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J. Med. Genet.* 32: 415-420.

Mansuy IM, van der Putten H, Schmid P, Meins M, Botteri FM, Monard D. (1993) Variable and multiple expression of protease nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development* 119(4): 1119-1134.

Maras B, Barra D, Dupre S, Pitari G. (1999) Is pantetheinase the actual identity of mouse and human vanin-1 proteins? *FEBS Lett.* 461(3): 149-52.

Margarit E, Guillen A, Rebordosa C, Vidal-Taboada J, Sanchez M, Ballesta F, Oliva R. (1998) Identification of conserved potentially regulatory sequences of the SRY gene from 10 different species of mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(2): 370-377.

Marshall OJ, Harley VR. (2001) Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Lett.* 496: 75-80.

Martin F, Malergue F, Pitari G, Philippe JM, Philips S, Chabret C, Granjeaud S, Mattei MG, Mungall AJ, Naquet P, Galland F. (2001) Vanin genes are clustered (human 6q22-24 and mouse 10A2B1) and encode isoforms of pantetheinase ectoenzymes. *Immunogenetics* 53(4):296-306.

Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.* 7: 958-968.

Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888): 559-63.

Mayer A, Mosler G, Just W, Pilgrim C, Reisert I. (2000) Developmental profile of Sry transcripts in the brain. *Neuro. Genet.* 3: 25-30.

Mazaud S, Oreal E, Guigon CJ, Carre-Eusebe D, Magre S. (2002) Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation. *Gene Expr. Patterns* 2(3-4): 373-377.

- McLaren A.** (2000) Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163: 3-9.
- Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL.** (2003) Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.* 34(1): 32-33.
- Melton L.** (2001) How to build a testis. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(6):237-238.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M.** (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Intl. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- Merke DP, Tajima T, Baron J, Cutler GB Jr.** (1999) Hypogonadotropic hypogonadism in a female caused by an X-linked recessive mutation in the DAX1 gene. *N. Engl. J. Med.* 340(16): 1248-1252.
- Miller SW, Hayward DC, Bunch TA, Miller DJ, Ball EE, Bardwell VJ, Zarkower D, Brower DL.** (2003) A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. *Evol. Dev.* 5(3): 251-258.
- Mistelli T.** (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing : nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell. Sci.* 113: 1841-1849.
- Mittwoch U.** (2001) Genetics of mammalian sex determination: some unloved exceptions. *J. Exp. Zool.* 290(5): 484-489.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K.** (2003) Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the x chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol. Endocrinol.* 17(4): 507-519.

Molkentin JD. (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4,-5,-6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 275: 38949-38952.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 11(8): 1061-1072.

Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14(1): 62-68.

Morohashi K, Iida H, Nomura M, Hatano O, Honda S, Tsukiyama T, Niwa O, Hara T, Takakusu A, Shibata Y, et al. (1994) Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol. Endocrinol.* 8(5): 643-653.

Morrish BC, Sinclair AH. (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124(4): 447-57.

Mumm S, Zucchi I, Pilia G. (1997) SOX3 gene maps near DXS984 in Xq27.1, within candidate regions for several X-linked disorders. *Am. J. Med. Genet.* 72: 376-378.

Munsterberg A, Lovell-Badge R. (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.

Murer V, Spetz J-F, Hengst U, Altrogge LM, de Agostini A, Monard D. (2001) Male infertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (6): 3029-3033.

Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. (1998) Wilm's tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93(3): 445-454.

- Neithammer M, Kim E, Sheng M.** (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* 16: 2157-2163.
- Ner SS.** (1992) HMGs everywhere. *Curr. Biol.* 2: 208-210.
- Nordqvist K.** (1995) Sex differentiation-gonadogenesis and novel genes. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 727-736.
- Nordqvist K, Töhönen V.** (1997) An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development. *Int. J. Dev. Biol.* 41 : 627-638.
- Ogata T, Hawkins J, Taylor A, Matsuo N, Hata J-I, Goodfellow P.** (1992) Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype : support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J. Med. Genet.* 29: 226-230.
- Ohe K, Lalli E, Sassone-Corsi P.** (2002) A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1146-1151.
- Orkin SH.** (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80: 575-581.
- Orkin SH.** (2000) Diversification of hematopoietic cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1(1): 57-64.
- Ornitz DM, Itoh N.** (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2, 3005.1-3005.12.
- Osaki E, Nishina Y, Inazawa J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ohsugi M, Tezuka T, Yoshida M, Semba K.** (1999) Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 27(12): 2503-2510.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG.** (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51(6): 1091-1104.

Pailhous E, Vigier B, Vaiman D, Schibler L, Vaiman A, Cribiu E, Nezer C, Georges M, Sundstrom J, Pelliniemi LJ, Fellous M, Cotinot C. (2001) Contribution of domestic animals to the identification of new genes involved in sex determination. *J. Exp. Zool.* 290(7): 700-8.

Parker KL. (1998) The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140: 59-63.

Parker KL. (2002) Genes essential for early events in gonadal development. *Ann. Med.* 34: 171-178.

Parma P, Pailhous E, Cotinot C. (1999) Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol. Reprod.* 61(3): 741-748.

Patient RK, McGhee JD. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (4): 416-422.

Payen E, Pailhous E, Abou Merhi R, Gianquinto L, Kirszenbaum M, Locatelli A, Cotinot C. (1996) Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 40(3): 567-575.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, *et al.* (1991a) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67(2): 437-447.

Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE. (1991b) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumor. *Nature* 353(6343): 431-434.

Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. (1991c) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5(8): 1345-1356.

Pelliniemi LJ, Frojdman K. (2001) Structural and regulatory macromolecules in sex differentiation of gonads. *J. Exp. Zool.* 290(5): 523-8.

Pieau C. (1996) Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18: 19-26.

Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW. (2003) Porcine SRY is a target for steroidogenic factor 1. *Biol. Reprod.* 68: 1098-1106.

Pitari G, Malergue F, Martin F, Philippe JM, Massucci MT, Chabret C, Maras B, Dupre S, Naquet P, Galland F. (2000) Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett.* 483(2-3): 149-54.

Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* 13: 6115-6124.

Poulat F, Barbara PS, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, Berta P. (1997) The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272: 7167-7172.

Preiss S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans DA, Ogata T, Barroso I, Schafer AJ, Harley VR. (2001) Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 276: 27864-27872.

Racley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR. (1993) Expression of the Wilm's tumor suppressor gene, *Wt1*, during mouse embryogenesis. *Cell Growth Different.* 4: 1023-1031.

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkins J, Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. (1999a) Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 215: 208-220.

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. (1999b) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum. Mol. Genet.* 8: 989-996.

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14: 2587-2595.

Reddy JC, Licht JD. (1996) The *WT1* Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochim. Biophys. Acta.* 1287: 1-28.

Retaux S, Rogard M, Bach I, Failli V, Besson MJ. (1999) *Lhx9*: a novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain. *J. Neurosci.* 19(2): 783-793.

Rhind NR, Miller LM, Kopczynski JB, Meyer BJ. (1995) *Xol-1* acts as an early switch in the *C.elegans* male/hermaphrodite decision. *Cell* 55: 71-82.

Robert NM, Tremblay JJ, Viger RS. (2002) Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 Differentially Repress the GATA-Dependent Activity of Multiple Gonadal Promoters. *Endocrinology* 143: 3963-3973.

Roberts LM, Hirokawa Y, Nachtigal MW, Ingraham HA. (1999) Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev. Biol.* 208(4): 110-122.

Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15: 1998-2009.

Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, Simburger K, Milbrandt J. (1995) Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10939-10943.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning- A laboratory Manual*, ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Schepers G, Wilson M, Wilhelm D, Koopman P. (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergize with SF1 to activate the *Amh* promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* 278(30): 28101-28108.

Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. (2000) SRY induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127: 65-73.

Schwartz DR, Wu R, Kardia SL, Levin AM, Huang CC, Shedden KA, Kuick R, Misek DE, Hanash SM, Taylor JM, Reed H, Hendrix N, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. (2003) Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res.* 63(11): 2913-2922.

Sendo F, Araki Y. (1999) Regulation of leukocyte adherence and migration by glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins. *J. Leukoc. Biol.* 66(3): 369-374.

Sekiya I, Koopman P, Watanabe H, Ezura Y, Yamada Y, Noda M. (1997) SOX9 enhances aggrecan gene expression via the promoter region containing a single HMG box sequence in a chondrogenic cell line, TC6. *J. Bone Miner. Res.* 12: P222.

Shawlot W, Behringer RR. (1995) Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374(6521): 425-430.

Sharma PM, Bowman M, Madden S, Rauscher III FJ, Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, *WT1*. *Genes Dev.* 8: 720-731.

Shen JH-C, Ingraham HA. (2002) Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol.* 16: 529-540.

Shen MM, Hodgkin J. (1998) *Mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54: 1019-1031.

Shen W-H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. (1994) Nuclear receptor SF-1 regulates the *MIS* gene: a link to sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.

Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau Yfc, Saunders GF. (1997) The Wilm's tumor gene *WT1* can regulate genes involved in sex determination and differentiation : *SRY*, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin. Cancer Res.* 3(12Pt2): 2571-2580.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettings PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Reynold-O'Donnel E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 276: 33293-33296.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990a) A gene from the human sex-

determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346 (6281): 240-244.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovelle-Badge R, Goodfellow PN. (1990b) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346 (6281): 240-244.

Smalley MJ, Dale TC. (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 18(2): 215-230.

Srinivasan G, Post JF, Thompson EB. (1997) Optimal ligand binding by the recombinant human glucocorticoid receptor and assembly of the receptor complex with heat shock protein 70 correlate with high intracellular ATP levels in *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 60: 1-9.

Staley JP, Guthrie C. (1998) Mechanical devices of the spliceosomes : a molecular drama. *Genes Dev.* 13: 755-767.

Steitz JA. (1992) Splicing takes Holliday. *Science* 257: 888-889.

Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2013-2018.

Su H, Lau YF. (1993) Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am. J. Hum. Genet.* 52(1): 24-38.

Sudbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Sherer G. (1996) Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat. Genet.* 13(2): 230-232.

Suzuki K, Watanabe T, Sakurai S, Ohtake K, Kinoshita T, Araki A, Fujita T, Takei H, Takeda Y, Sato Y, Yamashita T, Araki Y, Sendo F. (1999) A novel

glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein on human leukocytes: a possible role for regulation of neutrophil adherence and migration. *J. Immunol.* 162(7): 4277-84.

Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM. (1999) Molecular cloning of FOG-2 : a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 956-961.

Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G. (1996) Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat. Genet.* 12(4): 404-409.

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. (1998) DAX-1 antagonizes SRY action in mammalian sex determination. *Nature* 391(6669): 761-767.

Szebenyi G et Fallon JF. (1999) Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cyt.* 185: 45-106.

Takayama K, Morohashi K, Honda S, Hara N, Omura T. (1994) Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. *J. Biochem. (Tokyo)* 116(1): 193-203.

Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G, Orkins SH. (1999) FOG-2 : A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 950-955.

Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM. (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627-4634.

Thakker R, Devriendt K. (2000) GATA-3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406: 419-422.

Tilman C, Capel B. (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 126: 2883-2890.

Tilman C, Capel B. (2002) Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 1-18.

Torres Maldonado LC, Landa Piedra A, Moreno Mendoza N, Marmolejo Valencia A, Meza Martinez A, Merchant Larios H. (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 129(1):2 0-6.

Tremblay JJ, Viger RS. (1999) Transcription factor GATA4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol. Endocrinol.* 13(8): 1388-1401.

Tremblay JJ, Viger RS. (2001) Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 64: 1191-1199.

Trimmer EE, Zamble DB, Lippard SJ, Essigmann JM. (1998) Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* 37: 352-362.

Tung P.S, Fritz I.B. (1987) Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by Sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic AMP derivatives and by blocking direct cell contact. *Dev. Biol.* 120: 139-153.

Uzumcu M, Westfall SD, Dirks KA, Skinner MK. (2002) Embryonic testis cord formation and mesonephric cell migration requires the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Biol. Reprod.* 67(6): 1927-35.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 400(21): 4225-4234.

Van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. (1993) Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J.* 12(10): 3847-3854.

Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vander-linden G, Hardling B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns J-P, Van de Ven W, Vanio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon A. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature* 397: 405-409.

Vassalli JD, Huarte J, Bosco D, Sappino AD, Velardi A, Wohlwen A, Erno H, Monard D, Berlin D. (1993) Protease-nexin 1 as an androgen-dependant secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J.* 12: 1871-1878.

Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Fellous M, McElreavey K. (1997) Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal. Definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 41 (2): 271-274.

Veitia R, Nunes M, Quintana-Murci L, Rappaport R, Thibaud E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K, Goncalves J, Silva M, Rodrigues JC, Caspurro M, Boierio F, Marques R, Lavinha J. (1998) Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 901-905.

Veitia RA, Salas-Cortes L, Ottolenghi C, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M. (2001) Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179(1-2): 3-16.

Veretnik S, Gribskov M. (1999) RNA binding domain of HDV antigen is homologue to the HMG box of SRY. *Arch. Virol.* 144: 1139-1158.

Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28(3): 216-7.

Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. (1998) Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 125(14): 2665-2675.

Vilain E, McElrealvey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M. (1992) Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 50(5): 1008-1011.

Vilain E, Guo W, Zhang YH, McCabe ER. (1997) DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line. *Biochem. Mol. Med.* 61(1): 1-8.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79: 111-1120.

Watanabe K, Clarke TR, Lane AH, Wang X, Donahoe PK. (2000) Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA4-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1624-1629.

Wegner M. (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acid Res.* 27: 1409-1420.

Weiss J, Meeks J, Hurley L, Jameson JL. (2003) Targeted deletion of Sox3 impairs gametogenesis in male and female mice. Third international symposium on the biology of vertebrate sex determination. Hawaii.

- Wertz K, Herrmann BG.** (2000) Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mech. Dev.* 98(1-2): 51-70.
- Whitfield LS, Lovell-Badge R et Goodfellow PN.** (1993) Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 364: 713-715.
- Wilhelm D, Englert C.** (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 16(14): 1839-1851.
- Wong JS, Gill SS.** (2002) Gene expression changes induced in mouse liver by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185(3): 180-96.
- Wright EM, Snopek B, Koopman P.** (1993) Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res.* 21(3): 744.
- Wright EM, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gandadharan U, Greenfield A, Koopman P.** (1995) The SRY-related gene SOX-9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9: 15-20.
- Xie WF, Zhang X, Sakano S, Lefebvre V, Sandell LJ.** (1999) Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J. Bone Miner. Res.* 14: 757-763.
- Yamazaki K, Kuromitsu J, Tanaka I.** (2002) Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator- activated receptor alpha agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(3): 1114-22.
- Yang H, Lu M, Zhang L, Whitsett JA, Morrissey EE.** (2002) GATA6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development* 129: 2233-2246.
- Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL.** (1998a) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20(4): 353-357.

Yu RN, Ito M, Jameson JL. (1998b) The murine DAX-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol. Endocrinol.* 12(7): 1010-1022.

Yuan X, Lu ML, Li T, Balk SP. (2001) SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 276(49): 46647-54.

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372: 635-641.

Zhang P, Mellon SH. (1996) The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase). *Mol. Endocrinol.* 10(2): 147-158.

Zhao LJ, Zhang S, Chinnadurai G. (2002) Sox9 transactivation and testicular expression of a novel human gene, KIAA0800. *J. Cell Biochem.* 86(2): 277-289.

Zimmermann S, Schwarzler A, Buth S, Engel W, Adham IM. (1998) Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol. Endocrinol.* 12(5): 706-713.

Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W, Adham IM. (1999) Targeted disruption of the *Ins13* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol. Endocrinol.* 13(5): 681-691.

